

**Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der  
Tunika von *Cystodytes dellechiaiei* DELLA VALLE  
(Urochordata, Ascidiacea)**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Eva-Maria Rottmayr

November 2001

Dissertation eingereicht am 08.November 2001

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Wanner
2. Berichterstatter: PD Dr. Roland Melzer

Tag der mündlichen Prüfung: 19.Februar 2002



*“Soon I could discern the outline of forms in the distance,  
and I recognised them as magnificent rocks  
carpeted with beautiful zoophytes  
and I was greatly impressed by this strange sight. “*

JULES VERNE, 1869  
*“Twenty Thousand Leagues under the Sea”*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Verwendete Abkürzungen</b> .....	III
<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>2. Material und Methoden</b> .....	18
2.1 Beschaffung und Hälterung der Tiere .....	18
2.2 Betäubung der Tiere .....	20
2.3 Isolierung von Zooiden und Larven .....	21
2.4 Gewinnung von Tunikaflüssigkeit und Zooidpreßsaft .....	22
2.5 Auswahl einer geeigneten Fixierungslösung .....	22
2.6 Lichtmikroskopie .....	24
2.6.1 Präparation unfixierter Gewebeproben für die Lichtmikroskopie .....	24
2.6.2 Präparation von Paraffinschnitten für die Lichtmikroskopie .....	28
2.7 Rasterelektronenmikroskopie .....	35
2.7.1 Konventionelle Rasterelektronenmikroskopie .....	35
2.7.2 Rasterelektronenmikroskopie von Gefrierbrüchen (Technik nach TANAKA) .....	36
2.7.3 Kryo-Rasterelektronenmikroskopie .....	37
2.8 Transmissionselektronenmikroskopie .....	39
2.9 Analytische Verfahren .....	41
2.9.1 Analyse der Tunikaflüssigkeit .....	41
2.9.2 Analyse der Tunikamatrix .....	41
2.9.3 Elementanalyse im Rasterelektronenmikroskop (EDX) .....	42
2.10 Fotografie und digitale Bildverarbeitung .....	43
<b>3. Ergebnisse</b> .....	44
3.1 Aufbau der Kolonien von <i>Cystodytes dellechiaiei</i> .....	44
3.2 Struktur und Zusammensetzung der Tunika von <i>Cystodytes dellechiaiei</i> .....	50
3.2.1 Tunikamatrix .....	50
3.2.2 Kontaktstellen zwischen Zooid und Tunika .....	59
3.2.3 Untersuchung von Tunikaflüssigkeit und Zooid-Presssaft .....	67
3.2.4 Struktur der Kalkschuppen .....	69
3.3 Tunikazellen .....	73
3.3.1 Blaszellen .....	73
3.3.2 Pigmentzellen in violetten Kolonien .....	75

3.3.3 Pigmentzellen in grünen Kolonien .....	88
3.3.4 Filopodiale Zellen .....	94
3.3.5 Kompartimentierte Zellen .....	108
3.3.6 Morulazellen .....	113
3.3.7 Häufigkeit und Verteilung der Tunikazellen innerhalb der Kolonie .....	118
3.4 Bakterien in der Tunika von <i>C. dellechiaiei</i> .....	121
3.4.1 Verteilung der Bakterien in der Tunika .....	121
3.4.2 Bakterientypen im Tunikagewebe .....	121
3.4.3 Bakterientypen der Isolate .....	127
3.5 Struktur der Larventunika von <i>C. dellechiaiei</i> .....	130
3.5.1 Vorkommen und Aufbau der Larven .....	130
3.5.2 Struktur der Larventunika .....	130
3.5.3 Bakterien in der larvalen Tunika .....	132
<b>4. Diskussion</b> .....	138
4.1 Die Tunika als Integument – protektive Mehrfachstrategien .....	138
4.2 Die Tunikamatrix – Biopolymere mit vielfältigen Eigenschaften.....	142
4.3 Regression im Aquarium – Überdauerung ungünstiger Umgebungsbedingungen .....	147
4.4 Toxische Farben – Pigmentzellen bei <i>C. dellechiaiei</i> .....	148
4.5 Filopodiale Zellen: Vorläufer für andere Tunikazellen ? .....	157
4.6 Kompartimentierte Zellen: Endlager oder Speicher ? .....	161
4.7 Bakterien in der Tunika.....	162
<b>5. Ausblick</b> .....	164
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	165
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	167
<b>Danksagung</b> .....	178
<b>Publikationen</b> .....	179
<b>Lebenslauf</b> .....	180

## Verwendete Abkürzungen

BSS	<i>balanced salt solution</i> (gepufferte Salzlösung)
C1	<i>cuticle 1</i> (äußere Cuticula der Larventunika)
C2	<i>cuticle 2</i> (innere Cuticula der Larventunika)
dest. H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DIC	<i>differential interference contrast</i> (Differentieller Interferenzkontrast)
EDX-Analyse	<i>energy dispersive X-ray</i> Analyse (Elementanalyse im REM)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
KLSM	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
LM	Lichtmikroskop
p. a.	<i>pro analysi</i> (Reinstoff)
REM	Rasterelektronenmikroskop
rER	rauhes Endoplasmatisches Reticulum
TEM	Transmissionselektronenmikroskop

# 1. Einleitung

## Die Blaue Apotheke – Pharmakologisch bedeutsame Inhaltsstoffe aus Ascidien

Seit Mitte der neunziger Jahre erscheinen immer wieder plakative Schlagzeilen in Zeitschriften und Tageszeitungen (s. Tafel 1): „Apotheke Ozean“ (P.M. 5/2000), „Heilkraft aus dem Meer“ (NATUR&KOSMOS 7/1999), „Medizin vom Meeresgrund“ (GEO 9/1994). Tatsächlich zeigte sich, daß viele Meerestiere, vor allem sessile Invertebraten, Stoffe mit antibiotischer oder antiproliferativer Wirkung enthalten (FAULKNER 1996). Über 200 internationale Patente aus der marinen Pharmaforschung wurden in den vergangenen Jahren angemeldet (DER SPIEGEL, 8/ 2000).

Schwämme, Bryozoen und Ascidien sind besonders vielversprechende Kandidaten für die Suche nach neuen Wirkstoffen (FAULKNER 1996). Besonders weit fortgeschritten ist die klinische Testung z.B. bei den Tumorinhibitoren Didemnin B (ein Cyclopeptid aus der tropischen Ascidie *Trididemnum solidum*, s. Tafel 1, Abb. 2) und Bryostatin 1 (ein Acetogenin aus der Bryozoe *Bugula neritina*, s. Tafel 1, Abb. 3) und dem entzündungshemmenden Manoalid aus dem Schwamm *Luffariella variabilis* (RINEHART et al. 1981, SCHLEE 1992, DE ROSA et al. 1998, RINEHART 2000). Auch antibiotische und HIV-hemmende Stoffe konnten aus Meerestieren isoliert werden (BENSLIMANE et al. 1988, AZUMI und ISHII 1990, RAMI REDDY et al. 1999, MITCHELL et al. 2000).

Die Lebensweise und natürliche Umgebung mariner Wirbelloser begünstigt die Entwicklung von Substanzen mit pharmakologisch nutzbaren Eigenschaften:

- „Chemische Waffen“ gegen Konkurrenten und Feinde  
Viele marine Invertebraten leben als sessile Filtrierer. Neben ausreichender Wasserströmung ist eine geeignete Unterlage eine wichtige Voraussetzung für die festsitzende Lebensweise. Hartes Substrat für die Festheftung sessiler Organismen kommt aber meist nur in Küstennähe vor, der Meeresboden der übrigen Bereiche ist überwiegend sandig oder schlammig. Entsprechend groß ist die Konkurrenz potentieller Siedler auf Felsflächen: Freie Areale bleiben meist nicht lange unbesetzt, bereits besetzte Substrate beherbergen auf kleinem Raum viele verschiedene Tier- und Pflanzenarten. Häufig überwachsen sessile Tiere sogar andere Organismen. Neben Verhaltensweisen und speziellen Verbreitungsstrategien spielen daher Gifte, Wachstumshemmer und andere abschreckende chemische Wirkstoffe häufig eine Rolle bei der Eroberung und Verteidigung eines Siedlungsplatzes (SCHLEE 1992, PAWLIK 1993, BECERRO et al. 1997).
- Antibiotische Wirkstoffe gegen Aufwuchsorganismen  
Natürliches Meerwasser enthält ca.  $10^3$  bis  $10^5$  Bakterienzellen/ml und ca.  $2 \times 10^3$  Phycomyceten/ml (zum Vergleich:  $3,4 \times 10^5$  Bakterien/ml in oligotrophen Seen,  $1 \times 10^2$  Bakterien/ml im Trinkwasser; GÖTTING et al. 1982, RHEINHEIMER 1991). Hartsubstrate, aber auch ungeschützte, lebende Oberflächen (Außenhaut von Meerestieren) werden daher rasch von Bakterien und Pilzen besiedelt und zum Teil auch geschädigt (STOECKER

## MEDIKAMENTE

Unter der Meeresoberfläche tobt ein Überlebenskampf der Arten: Um sie vor Feinden zu schützen, stattete die Evolution Schnecken, Korallen, Schwämme und Pilze mit raffinierten Giften aus. Jetzt entdecken Pharmaforscher den Reichtum der Apotheke Meer.

**D**er Schlafmann besänktete den Menschen mit Morphin, der Gemeine Fingerhut mit dem Herzmedikament Digitalin. Der Weide verdankt es das Aspirin, einem unerschöpflichen Schmerzhilfsmittel, das Wundermittel Penicillin.

Bis heute bedienen sich auch *moderne* Pharmabros in der Schatztruhe der Natur. Weltweit durchforsten die Forscher das Pflanz- und Tierreich auf der Suche nach neuen medizinischen Wirkstoffen. Immer wieder inspiriert sie der Erfindungsreichtum der Evolution.

Doch der Nachschub stockt. Viele Regionen der Erde scheinen abgegrast. Immer seltener stoßen die Pharmahändler auf

wirklich neue Substanzen. Frustriert stellen die Wissenschaftler fest: Die chemischen Grundstrukturen der untersuchten Substanzen ähneln sich.

Deshalb sind sich die Forscher inzwischen verstärkt einer anderen Grundlage zu: der Ozean. „95 Prozent aller Erfolge bei der Wirkstoffsuche stammen mittlerweile aus dem Meer“, schätzt der Biologe William Fenical von der kalifornischen Scripps Institution of Oceanography.

Unter dem Meeresspiegel tobt ein heftiger Kampf der Arten. Und was die Pharmakologen besonders fasziniert: Viel Meerestiere setzt sich gegen Freßfeinde und Bewachung nicht durch schnelle Flucht, dicke



### Meeresbiologe Karsten

Panzer, spitze Stacheln oder perfekte Tarnung zur Wehr. Schwämme etwa ruhen sich nicht vom Fleck und leuchten mitunter in grellen Bonbonfarben. Bei der Abschreckung von Feinden setzen sie auf die Chemie.

Meister der chemischen Kriegführung sind auch die Kegelschnecken. Jede der rund 500 Arten produziert einen anderen Giftcocktail aus bis zu 80 verschiedenen Toxinen. Jeder einzelne dieser Stoffe könnte wirksam gegen Rheuma, Epilepsie oder

„Im Meer schlummert ein enormes Reservoir medizinisch nutzbarer Substanzen“, glaubt auch der Meeresbiologe Karsten Schaumann vom Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven. Seit Anfang der sechziger Jahre erforscht er Pilze aus dem Meer. Schon früh ahnte er, dass sie auch Kranken von Nutzen sein könnten.

Lange Zeit aber interessierten sich die Pharmafirmen kaum dafür. Auf festem Boden gab es genügend Substanzen zu erforschen, die weitaus leichter zu erreichen waren. Und als der Reichtum der heimischen Flora erschöpft zu sein schien, schwärmten die Substanzfahnder in die tropischen Regenwälder Costa Ricas oder in entlegene Provinzen Chinas aus. Die Labors hatten mehr als genug damit zu tun, die Ernte aus diesen Regionen zu testen oder sie zu „screenen“, wie es im Labordutsch heißt.

Doch das ändert sich. Zurzeit läutet der Pharmakonzern Bayer eine „neue



264

DER SPIEGEL 8/2000

**P.M.** [www.pm-magazin.de](http://www.pm-magazin.de) Mai 2009 DM 6,-

**VIRTUELLE  
HEILIGEN  
VERFÄHRE**  
Wie  
entfalten  
die  
Realität  
im  
Computer

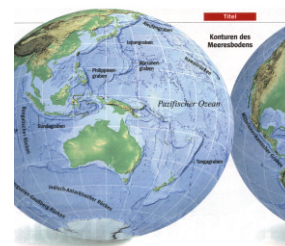
**Peter Muscolichers interessantes Magazin**



**Meeresbewohner liefern die Medizin der Zukunft**  
**Apotheke Ozean**

12

P.M. 5/2000



Nie geschehene Fabellereien mit eigenwilliger Lebenschemie, gigantische Lagerstätten von Metallen und gefrorenener Energie, unterseeische Schallsexperimente, die die kommende Klimakatastrophe vermassen: Mit Tauchbooten und obenstern drehen Forscher ins Dunkeln der Tiefsee vor – ein Aufbruch zur letzten Grenze.

DER SPIEGEL 31/1998

Ein Schatz im Meer war auf darauf, von der Pharmazie gehoben zu werden: Weil Meeresbewohner Stoffe von ganz anderer chemischer Struktur als an Land lebende Organismen produzieren können, steckt der Ozean voll potentieller pharmazeutisch nutzbarer Substanzen. Allein in der Klasse der Seescheiden (Ascidien) sind bereits hunderte medizinisch wirksamer Naturstoffe gefunden worden, die kranken Menschen gegen Pilze, Viren und als Zellgifte auch gegen Krebs helfen könnten.

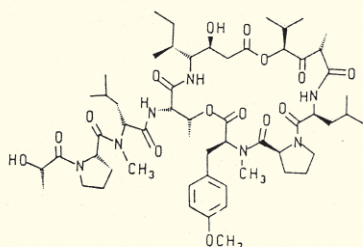
Seecheiden gehören zum Stamm der Manteltiere. Unter einem knorpeligen bis gallertartigen Überzug, dem sogenannten Mantel, sitzt ihr sackförmiger Körper. Nur im Larvenstadium können sich die Tiere im Wasser fortbewegen, später wachsen sie auf dem Meeresboden fest. Dort ernähren sie sich von im Wasser treibenden Kleinstlebewesen, die



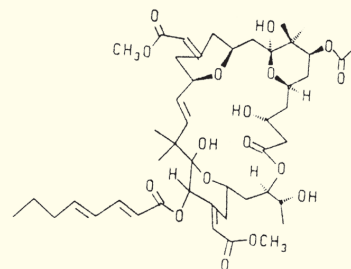
Die s  
Sees  
Dide  
unter  
vata  
ihren  
ren -  
stoff  
Phan



GEO 9/1994



### Didemnins B



Bryostatin 1

## Die »Blaue Apotheke«

1. Das Thema »Marine Naturstoffe« aus der Sicht populärwissenschaftlicher Zeitschriften.
2. Didemnin B, ein Tumoringhibitor aus der Ascidie *Trididemnum solidum* (aus PIETRA 1990).
3. Bryostatin 1, ein Tumoringhibitor aus der Bryozoe *Bugula neritina* (aus PIETRA 1990).

1978). Vor allem Schwämme, Korallen und Ascidien haben daher antibiotische Inhaltsstoffe entwickelt, die das Wachstum von Aufwuchsorganismen hemmen (AZUMI 1990, WAHL et al. 1994 und 1995, FAULKNER 1996).

- Wasser als universelles Transportmittel  
Marine Lebewesen sind ständig von Wasser umgeben. Vorteile bietet dies bei der Aufnahme von Nahrung: Viele sessile Meerestiere filtrieren vorbeifließendes Wasser und bekommen so Nährstoffe (und den benötigten Sauerstoff) „frei Haus“ geliefert und können fast ihr ganzes Leben an einem Platz festgeheftet verbleiben (TARDENT 1993). Gleichzeitig dient Wasser als Lösungsmittel für viele anorganische und organische Substanzen; es erleichtert, vor allem in strömungsexponierten Gebieten, die Verbreitung von Botenstoffen. Fraß- und Wachstumshemmer werden leicht verteilt, aber auch schnell verdünnt. Daher müssen entweder große Mengen der betreffenden Substanzen produziert werden, oder Stoffe verwendet werden, die bereits in geringen Konzentrationen die erwünschten Wirkungen zeigen. Aus diesem Grund können in marinen Invertebraten häufig hochpotente Wirkstoffe gefunden werden, die aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit auch als Pharmaka eingesetzt werden können.
- Chemische Signale ersetzen Optikreize  
Meerestiere und -pflanzen bewohnen einen Lebensraum, dessen Lichtverhältnisse sich grundlegend von denen an Land unterscheiden. Licht ist nur in begrenztem Maße vorhanden, bereits in geringen Wassertiefen kommt es durch die selektive Absorption des Wassers zur Extinktion bestimmter Lichtwellenlängen (vor allem im roten Bereich; TARDENT 1993). Farben können daher nicht immer zur inner- und zwischenartlichen Kommunikation genutzt werden. Viele Tier- und Pflanzenarten im Meer haben daher in stärkerem Maße zusätzlich chemische Botenstoffe entwickelt, die zum Beispiel zur Abschreckung von Feinden oder zur innerartlichen Kommunikation eingesetzt werden.

Diese Eigenschaften der marinen Umwelt begünstigten die Entwicklung einer großen Vielzahl an chemischen Signal- und Verteidigungsstoffen (COOPER et al. 1996, BECERRO et al. 1997). Viele dieser Substanzen haben antibiotische oder antiproliferative Wirkung und unterscheiden sich strukturell von den bisher verfügbaren Wirkstoffen aus Landlebewesen. Aus diesem Grund sind sie interessante Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe mit pharmakologischem Potential (PIETRA 1990, FAULKNER 1996).

Problematisch für die pharmakologische Nutzung von Wirkstoffen aus Meerestieren ist allerdings die Beschaffung der Substanzen. Vielfach können sie nicht im Labor synthetisiert werden. Ein Absammeln der natürlich vorkommenden Organismen zur Extraktion der Wirkstoffe würde auch bei häufigen Tierarten längst nicht für die Testung und Produktion von Medikamenten ausreichen und hätte unabsehbare ökologische Folgen (GEO 9/1994). Eine Alternative ist die Aquakultur, wie sie derzeit für *Bugula neritina* (Bryozoa) zur Gewinnung des Bryostatins in kalifornischen Meeresfarmen getestet wird.

Doch dieses Verfahren ist aufwendig und teuer und verursacht häufig ebenfalls ökologische und technische Probleme (FUSETANI 2000). Gezielte Vermehrung kann nur bei sehr wenigen marinen Invertebraten effektiv durchgeführt werden (GEO 9/1994, DER SPIEGEL 8/2000).

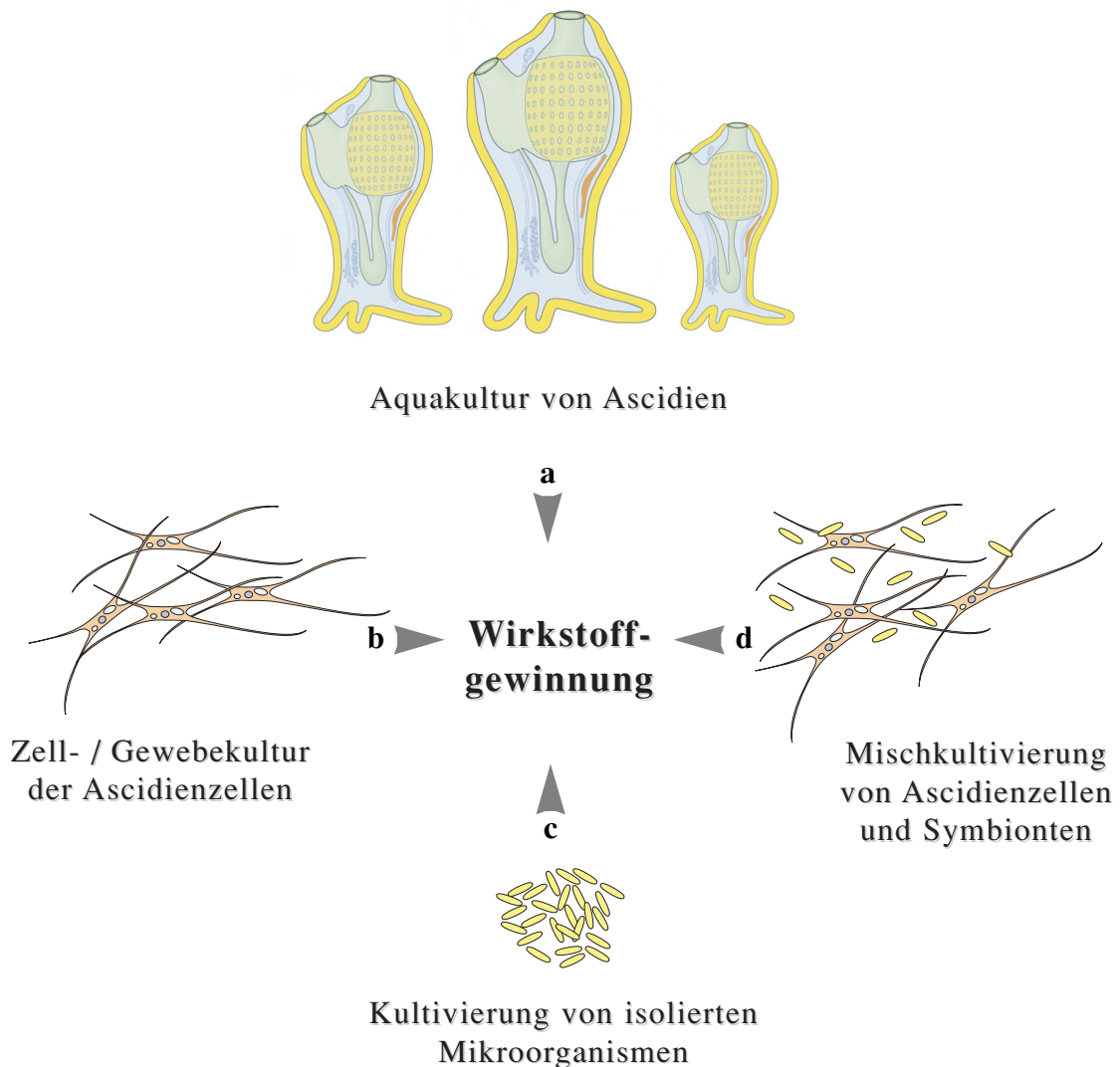
In jüngerer Zeit wird daher – parallel zur Aufklärung von Struktur und Synthesewegen interessanter Substanzen – nach neuen biotechnologischen Ansätzen gesucht. Einige Wirkstoffe aus Meeresorganismen können bereits mit Hilfe von Zellkulturen produziert werden (RORRER et al. 1999, MÜLLER et al. 2000). Bei Ascidien und Schwämmen stellte sich heraus, daß sie manche Wirkstoffe gemeinsam mit symbiontischen Mikroorganismen produzieren (HOLMSTRÖM et al. 1998, PEROVIC et al. 1998, HOLMSTRÖM und KJELLEBERG 1999, HAYGOOD et al. 1999). Wenn diese Beziehungen aufgeklärt werden könnten und es gelingt, eine Anzucht der betreffenden Mikroorganismen, so könnte es in Zukunft möglich sein, Wirkstoffe direkt aus diesen Mikroorganismen zu gewinnen (Tafel 2). Eine dritte Möglichkeit ist die Extraktion von Wirkstoffen aus Mischkulturen von Wirtszellen und Symbionten (s. Tafel 2).

Die Nutzung solcher Möglichkeiten steht allerdings erst am Anfang. Eine Voraussetzung für Anzucht und Wirkstoffproduktion über Zellen und/oder Symbionten ist eine umfassende Kenntnis der Symbiosepartner bzw. der wirkstoffproduzierenden Zellen. Bevor Zellen oder Mikroorganismen zur Wirkstoffproduktion eingesetzt werden können, muß zunächst geklärt werden, wo die Wirkstoffsynthese im lebenden Tier stattfindet und ob Beziehungen zwischen Gewebeelementen des Tieres und Mikroorganismen bestehen (Tafel 2). Cytologische Parameter von Wirtszellen und Symbionten, Analysen des Zellmilieus oder Informationen über die Lokalisation der Inhaltsstoffe liegen bisher von nur sehr wenigen Meerestieren vor.

*Cystodytes dellechiaiei*, die in dieser Arbeit untersuchte, koloniebildende Ascidienart, enthält eine ganze Reihe cytotoxischer und antileukämischer Substanzen (s. Tabelle 1), vor allem die Pyridoacridinalkaloide Shermilamin B, Kuanoniamin D und Ascididemin (STEFFAN, persönliche Mitteilung; Tafel 3). Cytologische und mikrobielle Daten zu diesem Organismus fehlten aber bisher völlig. In der vorliegenden Arbeit sollte daher mit licht- und elektronenmikroskopischen Methoden das cytologische Wissen über *Cystodytes dellechiaiei* erweitert werden.

*Cystodytes dellechiaiei* stellt damit auch einen Modellorganismus dar, an dem technische Möglichkeiten zur strukturellen Analyse unbekannter mariner Gewebe getestet werden sollen. Erfahrungen und Ergebnisse dieser Arbeit sollen in Verbundprojekte zu ähnlichen Themen, wie den Sonderforschungsbereich 369 „Molekulare Grundlagen des Sekundärstoffwechsels“ und das BMBF-Verbundprojekt „Endo- und exozytische Mikroorganismen aus marinen Makroorganismen: Eine Quelle für neue biologisch aktive Naturstoffe“ einfließen. Im Rahmen beider Projekte werden Makroorganismen aus verschiedenen Tierstämmen, darunter auch zahlreiche Ascidien, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. WANNER lichtmikroskopisch und ultrastrukturell untersucht.



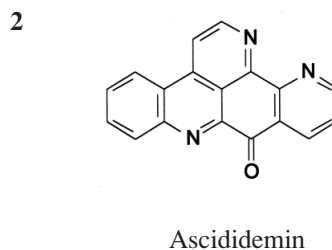
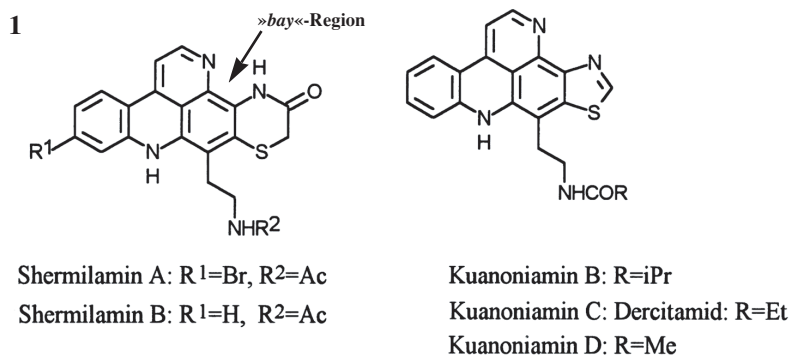
**Tafel 2**

Möglichkeiten zur Gewinnung pharmakologisch nutzbarer Wirkstoffe aus Ascidien und assoziierten Mikroorganismen.

- a. Wirkstoffgewinnung durch Extraktion der Ascidien. Da die natürlich vorkommenden Organismenbestände für pharmazeutische Wirkstoffnutzung häufig bei weitem nicht ausreichen würden bzw. aus ökologischen Gründen nicht abgesammelt werden können, wird versucht, wirkstoffproduzierende Organismen durch Aquakultur zu vermehren.
- b. Wirkstoffextraktion aus Zellkulturen. Zunächst müssen die Syntheseorte der Wirkstoffe im Tier bestimmt werden. Anschließend können die wirkstoffproduzierenden Zellen isoliert und kultiviert werden. Die erfolgreiche Isolierung und Kultivierung wirkstoffproduzierender Zellen setzt aber eine umfangreiche Kenntnis der Gewebeparameter, wie z.B. pH-Wert, Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, Zelltypen und Zellfunktionen voraus.
- c. Wirkstoffextraktion aus kultivierten Mikroorganismen. Im Gewebe von Ascidien vorkommende Mikroorganismen können für die Produktion von Wirkstoffen verantwortlich sein. Bei geeigneten Kulturbedingungen können Wirkstoffe aus den Kulturen gewonnen werden. Die Kulturbedingungen können durch strukturelle und biochemische Untersuchungen der Ascidie ermittelt werden.
- d. Wirkstoffextraktion aus Mischkulturen von Ascidienzellen und Symbionten. Beruht die Wirkstoffsynthese auf einem Zusammenspiel zwischen Ascidienzellen und symbiontischen Mikroorganismen, müssen die beiden Symbiosepartner gemeinsam kultiviert werden, um den gewünschten Naturstoff zu erhalten.

**Tabelle 1***Eigenschaften der Inhaltsstoffe von Cystodytes dellechiaiei*

<b>Inhaltsstoff:</b>	Shermilamin B	Kuanoniamin	Ascididemin
<b>Gefunden in:</b>	<i>C. dellechiaiei</i> violett	<i>C. dellechiaiei</i> violett	<i>C. dellechiaiei</i> violett
<b>Publikationen:</b>	CARROLL et al. 1989 STEFFAN et al. 1993 MCDONALD et al. 1994	CARROLL und SCHEUER 1990 STEFFAN et al. 1993	BONNARD et al. 1995 DASSONNEVILLE et al. 2000 STEFFAN, pers. Mitteilung
<b>Biologische Wirkung:</b>	cytotoxisch antileukämisch Topoisomerase II-hemmend DNA–Interkalation anti–HIV	mäßig cytotoxisch DNA–Interkalation	antileukämisch DNA–Interkalation
<b>Farbe:</b>	alkalisch: gelb sauer: rotviolett	alkalisch: gelb sauer: rotviolett	gelb (Farbe nicht pH–abhängig)
<b>Löslichkeit in Wasser:</b>	nach Ansäuern mit H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> mäßig löslich	nach Ansäuern mit H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> mäßig löslich	keine Angabe
<b>Löslichkeit in Methanol:</b>	Mäßig löslich	Mäßig löslich	keine Angabe



### Tafel 3

Pharmakologisch bedeutsame Inhaltsstoffe aus *Cystodytes dellechiaiei*

1. Strukturformeln von Shermilamin und Kuanoniamin (STEFFAN 1993). Pyridoacridinmoleküle besitzen eine »bay«-Region, in der z.B. Schwermetalle angelagert werden können.
2. Vermutete Strukturformeln von Ascididemin und Cystodamin (STEFFAN, unveröffentlicht)
3. Isoliertes Shermilamin B aus violetten Kolonien von *C. dellechiaiei*. In »dicker Schicht« hat Shermilamin B eine orangerote Farbe.

## **Tierpflanzen und kopflose Mollusken – Systematische Stellung der Ascidiacea**

Ascidien bieten aufgrund ihrer relativen phylogenetischen Nähe zu potentiellen „Nutzern“ der neuen Pharmaka (Mensch und Wirbeltiere) besonders gute Voraussetzungen für die Suche nach neuen bioaktiven Substanzen. Der phylogenetische Zusammenhang zwischen Chordaten und Tunikaten ist jedoch nicht „auf den ersten Blick“ ersichtlich. Die nahe Verwandtschaft zwischen Ascidien und Wirbeltieren wurde erst durch eingehende mikroskopische und histologische Studien verschiedener Entwicklungsstadien der Tunicata deutlich (GOETTE 1902, BERRILL 1950).

Im Tierstamm der Tunikaten (= Urochordaten), dem die Ascidiacea angehören, fehlen viele charakteristische Eigenschaften, die erst bei höheren Chordaten, v.a. bei den Wirbeltieren, herausgebildet wurden. So besitzen die Tunikaten z.B. keine Wirbelsäule, kein festes Skelett, keinen Kopf und kaum Sinnesorgane (s. Tafel 4).

Andererseits weisen Tunikaten eine Reihe von Besonderheiten auf, die bei höheren Chordaten nicht zu finden sind. Dies hat in früherer Zeit häufig zu einer verwirrenden systematischen Einordnung der Tunikaten geführt: C. V. LINNÉ ordnete 1758 und 1767 solitäre Ascidien bei „*Vermes–Mollusca*“ (Würmer–Weichtiere) und koloniebildende Ascidien bei „*Zoophyta*“ (Tierpflanzen) ein (LINNAEUS 1758, HUUS 1956). J. LAMARCK nannte 1801 und 1816 die zuvor als „*Mollusques acephales nuds*“ (kopf- und schalenlose Mollusken) und „*animaux apathiques*“ (teilnahmslose Tiere) beschriebenen (solitären) Ascidien erstmals „*Tunicata*“ (Manteltiere), ein Begriff, der noch heute Gültigkeit besitzt (BERRILL 1950, HUUS 1956). Die Morphologie der adulten Tiere führte zur Einteilung des Unterstammes Tunicata in vier verschiedene Klassen (BURIGHEL und CLONEY 1997):

1. Klasse: Appendicularia (= Larvacea, planktonische, solitäre Tunikaten)
2. Klasse: Ascidiacea (von griech. *askidion* = kleiner Weinschlauch; sessile solitäre und sessile koloniebildende Tunikaten)
3. Klasse: Thaliacea (= Salpen, planktonische, koloniebildende Tunikaten)
4. Klasse: Sorberacea (solitäre, carnivore Tunikaten der Tiefsee)

Die Klasse Ascidiacea untergliedert sich in folgende Subtaxa, die hauptsächlich nach Bau und Anordnung ihres Verdauungssystems unterschieden werden:

- Aplousobranchia
- Phlebobranchia
- Stolidobranchia

Die Zugehörigkeit der Ascidien zu den Chordaten ist am adulten Tier nicht sichtbar und wurde erst durch Untersuchung der Larven erkannt.

## Von der „Kaulquappe“ zum „kleinen Weinschlauch“ – Die Entwicklung der Ascidien

Während adulte Ascidien kaum noch Ähnlichkeit mit typischen Chordaten haben, zeigen die kaulquappenähnlichen Larven noch sämtliche Kennzeichen der Chordatiere (s. Tafel 4, Abb. 1):

- **Chorda dorsalis**

Die Chorda dorsalis (= Notochord, Rückensaite) ist ein stützender Gewebestab, der an der Dorsalseite der Tiere zwischen Darmkanal und Neuralrohr liegt. Sie dient zur Stabilisierung des Körpers und als Widerlager der Körpermuskulatur. Bei den Wirbeltieren entstand aus der einfachen, elastischen Chorda dorsalis das komplizierte kalkig–knorpelige Skelett.

Die Larven der Tunicata besitzen nur im hinteren Rumpfabschnitt eine Chorda dorsalis . Von dieser Eigenschaft leitet sich der heute verwendete Name „Urochordata“ (= Schwanz–chordaten) ab, der häufig als Synonym für „Tunicata“ gebraucht wird.

- **Dorsales Neuralrohr**

Bei den meisten Tierstämmen sind die Hauptnerven an der Bauchseite (= ventral) angelegt. Nur die Chordaten besitzen dorsale Hauptnerven, die zusammen mit der Chorda dorsalis und den kompakten, segmentierten Körpermuskeln eine stabile Einheit bilden.

- **Kiemendarm**

Der Kiemendarm, das Atmungs– bzw. Nahrungsaufnahmeorgan der Chordaten, stellt den Pharynx (= Schlund, Anfang des Verdauungskanal) dar. Wasser wird eingestrudelt und filtriert, im Gegensatz zum Atmungsmechanismus der Invertebraten muss jedoch das Wasser nicht den gesamten Verdauungskanal passieren, sondern wird bereits im Kiemendarm wieder ausgeschieden. Aus diesem Pharynx entstanden in der späteren Entwicklung der Wirbeltiere Kiemen und Lungen, also spezielle Organe für den Gasaustausch.

- **Muskulöser, postanaler Schwanz**

Während bei den meisten Invertebraten der After am Schwanzende liegt, besitzen Chordaten einen postanalen Schwanz, der sowohl durch die Chorda dorsalis, als auch durch segmentierte Muskulatur verstärkt ist. Bei den meisten wasserlebenden Chordaten, also auch bei Tunikatenlarven, dient dieser der Fortbewegung.

Heute werden die Tunicata daher als Unterstamm der Chordata betrachtet.

Bei adulten Ascidien werden die typischen Chordatenmerkmale zum Teil zurückgebildet, da sie für die Lebensweise des adulten (meist sessilen) Tieres nicht mehr benötigt werden (s. Tafel 4, Abb. 2 und 3). Die freischwimmenden Larven machen daher eine vollständige Metamorphose durch (WEHNER und GEHRING 1990; s. Tafel 4, Abb. 2).

Während der Metamorphose zum sessilen Tier durchläuft die freischwimmende Ascidienlarve folgende Schritte:

1. Schwimmphase (Dauer: wenige Minuten bis 24 Std.), Aufsuchen eines geeigneten Substrats (z.B. Felsen, Makroalgen, andere Meerestiere, LUDWIG 1883).
2. Anheftung am Substrat (Tafel 4, Abb. 2).
3. Rückbildung der Chorda dorsalis.
4. Rückbildung des Neuralrohres zum kompakten Ganglion.
5. Rückbildung des Schwanzes.
6. Drehung des Körpers und Ausrichtung der Ein- und Ausstromöffnungen zum freien Wasser hin (Tafel 4, Abb. 2).
7. Vergrößerung des Kiemendarms, Wachstum des Tieres.

Bei koloniebildenden Ascidien:

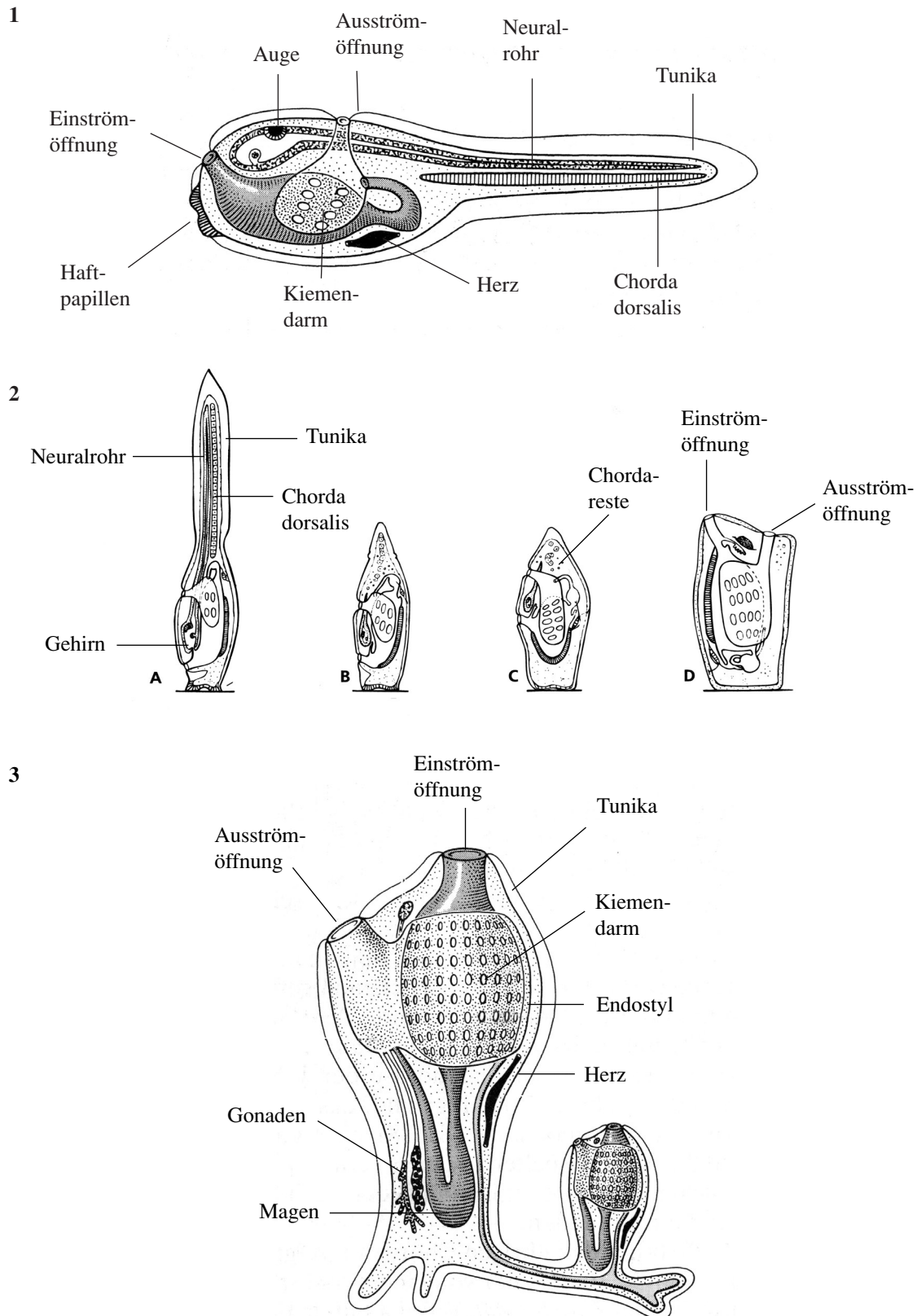
8. ungeschlechtliche Vermehrung (Knospung) und Aufbau einer Kolonie mit mehreren genetisch einheitlichen Zooiden (Einzeltieren).

Diese Merkmale charakterisieren die Tunikaten als einen phylogenetischen Nebenzweig, der zwischen den höheren Chordaten und den chordalosen Invertebraten liegt.

### **Cellulose, Pigmente, Symbionten – Frühere Untersuchungen zur Ascidientunika**

Aufgrund der taxonomischen und entwicklungsgeschichtlichen Bedeutung der oben genannten Merkmale gibt es einige, auch ultrastrukturelle Untersuchungen zum Bau der an der Metamorphose direkt beteiligten Zooid- und Larvengewebe. Wesentlich geringer ist dagegen die Anzahl der Untersuchungen, die sich mit dem Aufbau der Tunika (= Mantel) befassen. Obwohl bereits früh bekannt war, daß die Tunika celluloseartige Substanzen und verschiedene Zellen enthalten kann (ABDERHALDEN 1911, GRASSE 1948), sind bis heute nur für wenige Ascidien genauere Informationen verfügbar. Auffallend ist jedoch, daß sich die Tuniken der einzelnen Ascidienarten offensichtlich sehr stark voneinander unterscheiden (Tabelle 2 und Tafel 5, Abb. 1 und 2).

Die Tunika ist eine der einschichtigen Epidermis anliegende Hülle, die das gesamte Tier umgibt. Ihre Konsistenz variiert –je nach Ascidienart– von weich–gelatinös (z.B. *Polyclinum aurantium*) bis zäh–ledrig (z.B. *Pyura dura*). Bei manchen Ascidien enthält die Tunika Kalkkonkremente, die das Gewebe zusätzlich stabilisieren (MILLAR 1970, MONNIOT 1970, LOWENSTAM 1989, LAMBERT 1992, LAMBERT und LAMBERT 1996). Die Tunika kann beträchtliche Ausmaße erreichen, sie dient dem Schutz der Zooide und der Befestigung der Kolonien am Substrat (GODEAUX 1964). Bei koloniebildenden Ascidien und Salpen stellt sie die Grundmatrix dar, in die alle Zooide (Einzeltiere) ganz oder teilweise eingebettet sind.



**Tafel 4**

Von der »Kaulquappe« zur Ascidie

1. Schematische Darstellung der Ascidienlarve (aus: WEHNER und GEHRING 1990).
2. Schematische Darstellung der Anheftung und Metamorphose der freischwimmenden Ascidienlarve zur sessilen, adulten Ascidie (aus: WESTHEIDE und RIEGER 1996 ).
3. Schematische Darstellung einer adulten stolonienbildenden Ascidie (aus: WEHNER und GEHRING 1990).

### **Zusammensetzung der Tunika**

Biochemische Untersuchungen haben nachgewiesen, dass die Tuniken vieler Ascidien ein celluloseartiges Material, das sogenannte „Tunicin“, enthalten. So isolierte Abderhalden bereits 1911 Cellulose aus der Tunika von *Phallusia mammillata* (ABDERHALDEN 1911). Untersuchungen mehrerer Autoren an *Halocynthia*, *Ciona* und anderen solitären Ascidienarten (SMITH 1970b, SMITH und DEHNEL 1970 und 1971, PATRICOLO und DE LEO 1979, VAN DAELE et al. 1992) zeigten jedoch, daß das Tunicin keine reine Cellulose ist, sondern auch Proteine enthält. Gleiches gilt auch für die vermutlich bisher einzige, daraufhin untersuchte koloniebildende Ascidie *Polyclinum madrasensis* (KRISHNAN und RAMAMURTHI 1975). Die genaue Zusammensetzung des Tunicins ist bisher jedoch noch nicht geklärt.

Auch andere Bausubstanzen, z.B. Mukopolysaccharide, konnten in der Tunika von *Halocynthia pyriformis*, *Halocynthia papillosa* und *Styela plicata* nachgewiesen werden (SMITH und DEHNEL 1970, ALBANO und MOURÃO 1983, PAVÃO et al. 1998). LAMBERT untersuchte die Knospungsvorgänge und Kalkschuppenbildung bei *Cystodytes lobatus*, einer pazifischen *Cystodytes*-Art, und stellte durch histochemische Färbereaktionen fest, daß die Tunika saure, sulfatierte Mukopolysaccharide enthält (LAMBERT 1979).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von VAN DAELE et al. (1992) zeigten, daß die Tunikafasern bei der Solitärascidie *Halocynthia papillosa* aus einem Cellulosekern und einer Hülle aus sauren Mukopolysacchariden und Proteinen bestehen (vgl. Tabelle 2). Die Tunikamatrix von *Ciona intestinalis* enthält gebänderte Fasern, die aus einem celluloseartigen Polysaccharid und kollagen-elastinähnlichen Proteinen aufgebaut sind (PATRICOLO und DE LEO 1979; vgl. Tabelle 2).

Die Angaben zum Syntheseort der Tunikamatrix sind nicht einheitlich. Während SMITH (1970b) davon ausgeht, daß die Tunikamatrix (bei *Halocynthia aurantium*) primär von den Epidermiszellen der Zooide synthetisiert wird, fanden LÜBBERING-SOMMER et al. (1996) Evidenzen für eine Cellulosesynthese in extrazellulären Bereichen der Tunika. Die Tunikazellen selbst, die aus ausgewanderten Blutzellen hervorgehen, sind am Aufbau der Tunika wahrscheinlich nur geringfügig beteiligt (BURIGHEL und CLONEY 1997). Nach SMITH (1970b) könnten „mature morula cells“ im Blut verantwortlich für die Bildung des Proteinanteils der Tunika von *Halocynthia aurantium* sein. Die Beteiligung von Morulazellen wurde für die Synthese der kollagen-elastinähnlichen Proteine in der Tunikamatrix von *Ciona intestinalis* bestätigt (PATRICOLO und DE LEO 1979).

Nach außen hin wird die Tunika von einer dünnen Cuticula abgeschlossen (HIROSE et al. 1992, LÜBBERING-SOMMER et al. 1996, BURIGHEL und CLONEY 1997), die glatt oder mit mikroskopisch kleinen Papillen besetzt sein kann (HIROSE et al. 1992).



**Tabelle 2**

Literaturangaben zu Tunika-Matrixfasern verschiedener (solitärer) Ascidienarten

Publikation	Ascidien species	Tunikamatrix
FREY-WYSSLING und FREY 1950	<i>Phallusia mammillata</i> <i>Ciona intestinalis</i>	Mikrofibrillen ( $\varnothing$ 25 nm) mit gleichem Durchmesser wie Cellulosefibrillen der Pflanzenzellwand „Tunicin“ bei <i>P. mammillata</i> durch inkrustierende Substanzen verklebt Tunicin bei <i>C. intestinalis</i> bildet bandartige Stränge
MISHRA und COLVIN 1969	<i>Boltenia ovifera</i> <i>Molgula griffithsii</i>	Zufällig orientierte Fibrillen, selten bandartige Aggregate, manchmal parallele Fibrillen Fibrillen zeigen Röntgenbeugungsmuster von Cellulose Tunika enthält außerdem „amorphes Glykoprotein“
DE LEO et al. 1977 PATRICOLO und DE LEO 1979	<i>Ciona intestinalis</i>	Faserbündel ( $\varnothing$ 80-600 nm) aus flachen bandartigen Fasern ( $\varnothing$ 10-13 nm), zusammengesetzt aus osmiophilen Mikrofibrillen ( $\varnothing$ 3,5-5 nm). Vereinzelte gebänderte (Kollagen?) Fasern ( $\varnothing$ 20-38 nm).
VAN DAELE 1990 VAN DAELE 1992	<i>Halocynthia papillosa</i> <i>Phallusia mammillata</i>	Fasern mit nicht kontrastiertem Cellulosekern ( $\varnothing$ 5-20 nm) und stark kontrastierter Hülle aus Proteinen und Mukopolysacchariden. Keine Kollagenfasern.

**Tunikazellen**

Bereits in zoologischen Lehrbüchern des 19. Jahrhunderts wird beschrieben, daß die Tunika der Ascidien nicht nur eine einfache Cuticula, sondern eine Art Bindegewebe ist, das sowohl aus (ursprünglich mesodermalen) Zellen als auch aus einer – häufig transparenten – Matrixsubstanz gebildet wird (HERTWIG 1892, LUDWIG 1883). Genauere Untersuchungen von Bau und Funktion der Tunikazellen wurden jedoch erst in jüngerer Zeit durchgeführt (HIROSE et al. 1991, HIROSE 1992, HIROSE et al. 1994, DI BELLA et al. 1998). Neben der extrazellulären, faserigen Matrix finden sich in der Tunika vieler Ascidien auch unterschiedliche Typen von Tunikazellen. Dies gilt offensichtlich vor allem für die häufig kompliziert gebauten Tuniken der koloniebildenden Ascidien. Die Tunika von *Aplidium yamazii* enthält z.B. sieben verschiedene Tunikazelltypen (HIROSE et al. 1994a und 1994b).

Bei einigen tropischen Ascidienarten wurden innerhalb der Tunika symbiontisch lebende Cyanobakterien nachgewiesen (PARDY 1981, PARRY und KOTT 1988, SWIFT 1991, HIROSE et al. 1996b).

Filopodiale Zellen sind bei Ascidien offensichtlich sehr weit verbreitet. Bei verschiedenen Arten konnten sie sowohl im Blut als auch in der Epidermis und der Tunika nachgewiesen werden und es wird angenommen, daß sie aus den Zooiden in die Tunika wandern (DE LEO et al. 1981, VAN DAELE 1990, HIROSE et al. 1991 und 1996a). Die vielfältigen Fähigkeiten filopodialer Zellen spiegeln sich in ihrer uneinheitlichen Nomenklatur wider: „*tunic granulocytes*” (DE LEO et al. 1981), „*amoeboid cells*” (HIROSE et al. 1991), „*hyaline and granular amoebocytes*” (BALLARIN et al. 1994, CIMA et al. 1996), „*tunic phagocytes*” (CHIBA et al. 1998).

Filopodiale Zellen sind zu amöboider Bewegung innerhalb der Tunika fähig (IZZARD 1974). Bei verschiedenen Ascidien konnte gezeigt werden, daß filopodiale Zellen als „Aufräumkommando” fungieren und Bakterienzellen und Zelldebris in der Tunika phagocytieren (MILANESI und BURIGHEL 1978, DE LEO et al. 1981, HIROSE et al. 1994a). In filopodialen Zellen von *Clavelina miniata* konnte Biolumineszenz beobachtet werden (CHIBA et al. 1998).

Morulazellen sind offensichtlich charakteristische und ubiquitäre Bestandteile des Ascidienblutes (BALLARIN et al. 1995) und an entscheidenden Prozessen wie der Agglutination des Blutes bei Verletzung von Blutgefäßen (ROWLEY et al. 1984) oder der Autoimmunreaktion (BALLARIN et al. 1995, RINKEVICH et al. 1998) beteiligt. Häufig können sie auch in der Ascidientunika beobachtet werden (DE LEO et al. 1981, VAN DAELE 1990, HIROSE et al. 1991, HIROSE 1992, HIROSE et al. 1994a und 1994b, CHIBA et al. 1998). Nach SMITH und DEHNEL (1971) synthetisieren Morulazellen den Proteinanteil der Tunikamatrix. Bei manchen Ascidien (Stolidobranchia, Phlebobranchia) enthalten Morulazellen große Mengen an Eisen oder Vanadium (SMITH 1970a, GOODBODY 1974, MILANESI und BURIGHEL 1978), die sie wahrscheinlich mit Hilfe der Tunichrome (reduzierende Polyphenole; SMITH 1989, TAYLOR et al. 1997) aus dem Meerwasser anreichern können. Die biologische Funktion der Vanadium- oder Eisenanreicherung ist noch unbekannt.

Die Tunika einiger Ascidienarten (z.B. *Botryllus schlosseri*) wird von Blutgefäßen versorgt (BURIGHEL und CLONEY 1997).

### **Pigmente**

Die Tunika mancher Ascidien ist intensiv gefärbt (z.B. Tunika von *Phallusia nigra*, *Halocynthia papillosa*; s. Tafel 5, Abb. 1). Andere Arten haben dagegen eine fast farblose, transparente Tunika (z.B. *Ciona intestinalis*, *Clavelina lepadiformis*; s. Tafel 5, Abb. 2). Bei einigen Arten wurden bereits Pigmentansammlungen in der Tunika beobachtet (HUUS 1956). Zellen als Speicher für Farbstoffe wurden aber bisher nur im Blut von *Botryllus*-Verwandten und in der Tunika der Solitärascidie *Phallusia nigra* nachgewiesen (BURIGHEL 1983, HIROSE et al. 1998b und HIROSE 1999).

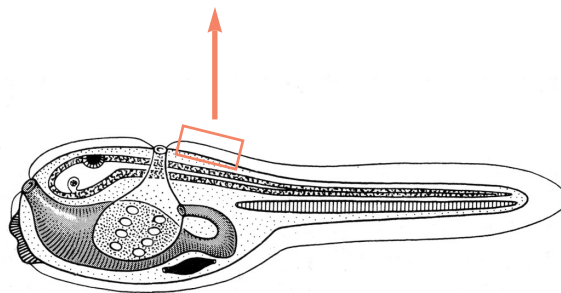
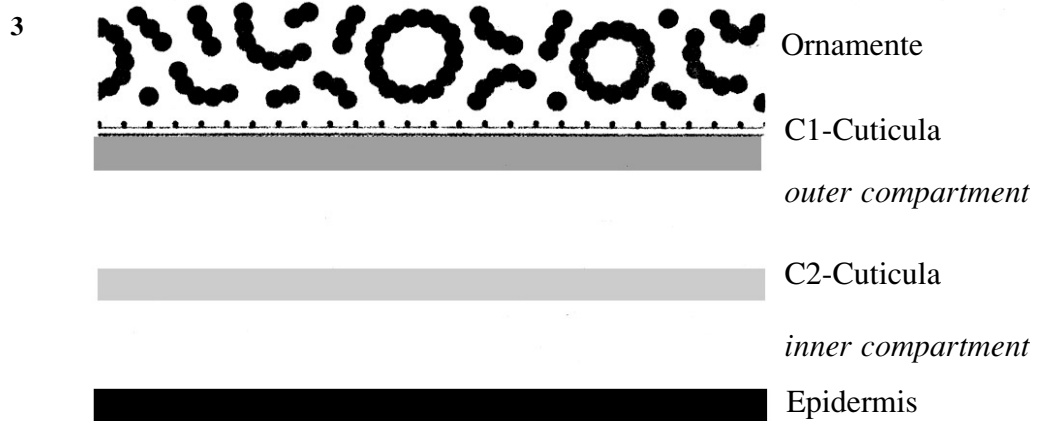
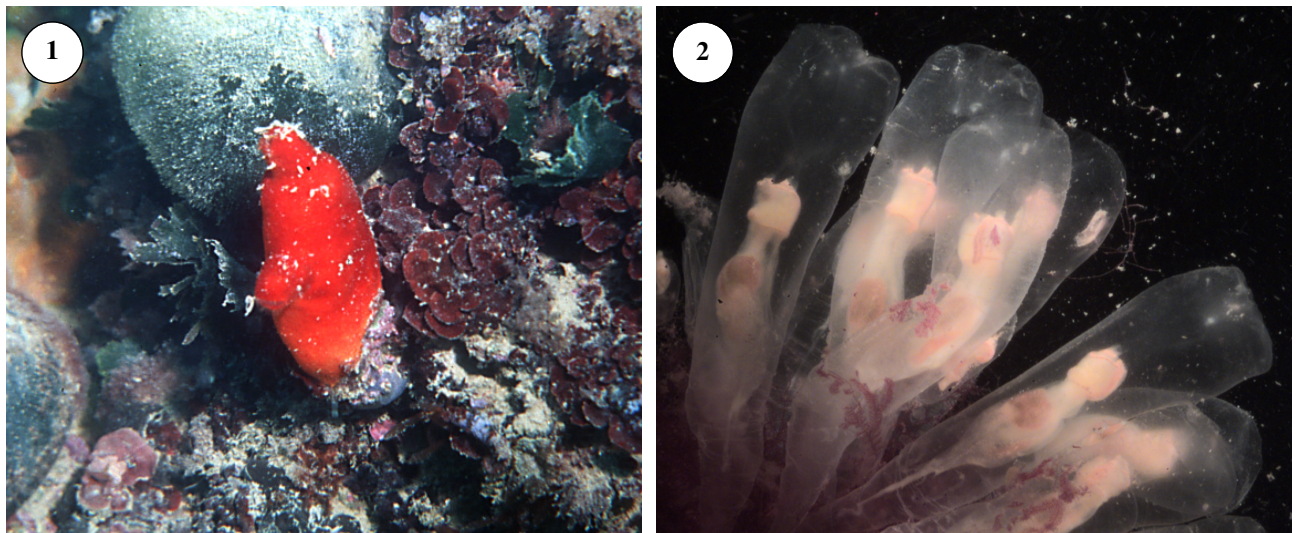
Über die Pigmentierung von *Cystodytes dellechiaiei* sagt VAN NAME lediglich aus, daß ein graubraunes Pigment in „*oval corpuscles*” (ovalen Körperchen) in den Kolonien enthalten sei.

Die Farbe der Kolonien von *Lissoclinum punctatum* wird von Symbionten in der Tunika beeinflusst: während grüne Kolonien große Mengen des grünen Cyanobakteriums *Prochloron sp.* enthalten, konnten in roten Kolonien neben *Prochloron sp.* auch rote Cyanobakterien nachgewiesen werden (PARRY und KOTT 1988, HIROSE et al. 1996b, HIROSE et al 1998a).

### **Die larvale Tunika**

Die larvale Tunika (s. Tafel 5, Abb. 3) ist bei den untersuchten Ascidienarten aus vier verschiedenen Schichten aufgebaut (CLONEY und CAVEY 1982, CLONEY 1990, BURIGHEL und CLONEY 1997). Die äußerste Schicht (sog. C1–Schicht) ist eine dünne, zellfreie Cuticula und besitzt häufig papillenförmige oder aus mehreren Körnchen zusammengesetzte, perlschnurförmige Ornamente aus hydrophilen Substanzen, die die Benetzbarkeit der freischwimmenden Larven verbessern. Darunter folgt das sog. „outer compartment“, eine Schicht aus Matrixfasern, die vor allem im caudalen Bereich den Flossensaum der Larve stabilisiert. Unter dieser Faserschicht liegt eine zweite Cuticula, die sog. C2–Schicht. Da bei der Metamorphose der Larven zum juvenilen Tier die C1–Schicht und das „outer compartment“ abgebaut werden, wird die C2–Schicht beim adulten Tier zur äußeren Begrenzung gegenüber der Meerwasserumgebung. Die C2–Schicht besitzt bei manchen Ascidienarten submikroskopisch kleine, punktförmige Protrusionen oder zahlreiche Falten. Zwischen der C2–Schicht und der Epidermis der Larve liegt schließlich noch eine zweite Lage aus Matrixfasern („inner compartment“), in die zahlreiche Zellen eingebettet sein können. Diese Schicht stellt, zusammen mit der C2–Cuticula, die spätere Tunika der adulten Ascidien dar (BURIGHEL und CLONEY 1997).

Bei Ascidien, die Cyanobakterien als Symbionten in ihrer Tunika oder ihren Zooidgeweben haben, können in der C2–Schicht der Larven bereits homogene Populationen der betreffenden Cyanobakterien nachgewiesen werden.



### Tafel 5

#### Erscheinungsformen der Tunika

1. *Halocynthia papillosa*. Die Tunika ist intensiv orangerot pigmentiert und rauh.
2. *Clavelina dellavallei*, Ascidie mit farblos-transparenter, glatter Tunika.
3. Die Tunika der Ascidienlarven ist aus vier verschiedenen Schichten aufgebaut: C1-Cuticula mit Ornamenten, *outer compartment*, C2-Cuticula und *inner compartment*, das direkt an die Epidermis der Larve angrenzt (nach BURIGHEL und CLONEY 1997). Bei der Metamorphose der Larven bleiben nur C2-Cuticula und *inner compartment* erhalten und bilden die Tunika der adulten Tiere.

## Ziele

Die Anregung zur Durchführung struktureller Untersuchungen an *Cystodytes dellechiaiei* entstammt der Kooperation zwischen den Arbeitsgruppen von Dr. B. STEFFAN (Institut für Organische Chemie, LMU München) und Prof. G. WANNER (Botanisches Institut, LMU) im Rahmen des SFB 369 „Molekulare Grundlagen des Sekundärstoffwechsels“. Bei der Untersuchung der Molekülstruktur und der Biosynthese der von Dr. B. STEFFAN isolierten, biologisch aktiven Pigmente wurde festgestellt, daß die an der Synthese der Wirkstoffe beteiligten Gewebe oder Zellen noch nicht identifiziert sind. Die komplexen Strukturen und Synthesewege der Inhaltsstoffe lassen aber vermuten, daß die Alkaloide mit Hilfe zellulärer Enzyme synthetisiert werden. Zur Gattung *Cystodytes* gab es zu Beginn dieser Dissertation nur eine strukturell orientierte Publikation (Arbeit zu Knospungsvorgängen bei *Cystodytes lobatus*, LAMBERT 1979), aber immerhin schon 12 Veröffentlichungen zu bioaktiven Inhaltsstoffen verschiedener (häufig nur ungenau bestimmter) *Cystodytes*-Arten. Zur Identifikation der an der Synthese beteiligten Zellen müssen die Pigmente zunächst im Organismus **lokalisiert** werden. Anschließend können die Eigenschaften der beteiligten Zellen/Gewebe **charakterisiert** werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst der **Aufbau der Kolonien** von *Cystodytes dellechiaiei* untersucht werden, um eine Orientierung in den unbekannten Geweben zu ermöglichen. Eventuelle strukturelle Unterschiede zwischen verschiedenen im Verbreitungsgebiet vorkommenden **Farbvarianten** von *C. dellechiaiei* sollten dabei vergleichend untersucht werden.

Die Lage und Ausrichtung der Zooide sollte dabei ebenso bestimmt werden, wie der Aufbau der Tunika. Die Gewinnung von Informationen über **zelluläre Elemente** in der Tunika war dabei das primäre Ziel, daneben sollte aber auch die **Tunikamatrix** als wichtige Gewebekomponente näher charakterisiert werden.

Bei ausreichender Kenntnis der Gewebeelemente sollte versucht werden, die pharmakologisch aktiven Pyridoacridinalkaloide in der Ascidienkolonie zu lokalisieren und Hinweise auf deren Syntheseorte zu erarbeiten. Zelluläre Strukturen zur **Kompartimentierung und Speicherung** der cytotoxischen Alkaloide sollten untersucht werden.

Ein dritter wichtiger Schwerpunkt dieser Arbeit war die Suche nach eventuell im Gewebe vorkommenden **Mikroorganismen**, und die Untersuchung von Beziehungen zwischen Ascidiengeweben und Mikroorganismen auf der Basis ultrastruktureller Daten.

In Kooperation mit Prof. R. WIRTH (Universität Regensburg) sollte versucht werden, Bakterien aus den Geweben von *C. dellechiaiei* zu isolieren, anzuziehen und elektronenmikroskopisch zu untersuchen. Parallel dazu sollte von Dr. B. STEFFAN (Institut für Organische Chemie, LMU München) überprüft werden, ob die Isolate pharmakologisch bedeutsame Sekundärstoffe oder deren Vorstufen enthalten.

## 2. Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedenste präparative, mikroskopische und analytische Methoden eingesetzt. Limitierender Faktor bei der Präparation war fast immer die begrenzte Menge an frischem Tiermaterial – viele Untersuchungen wurden deshalb an fixierten Proben durchgeführt. Um die zur Verfügung stehenden Tiere in möglichst gutem Zustand zu erhalten, wurde zunächst der Transport und die Hälterung der Tiere optimiert. Anschließend wurde nach einem optimalen Konservierungs- und Fixierungsmittel gesucht, das einen guten Strukturhalt der Proben über möglichst lange Zeiträume hinweg gewährleistet. Schließlich wurden präparative Methoden und Analysen so modifiziert, daß sie mit geringen Materialmengen und bereits vorhandenen Proben durchführbar waren (z.B. Elementanalyse an Harz- und Paraffinschnitten).

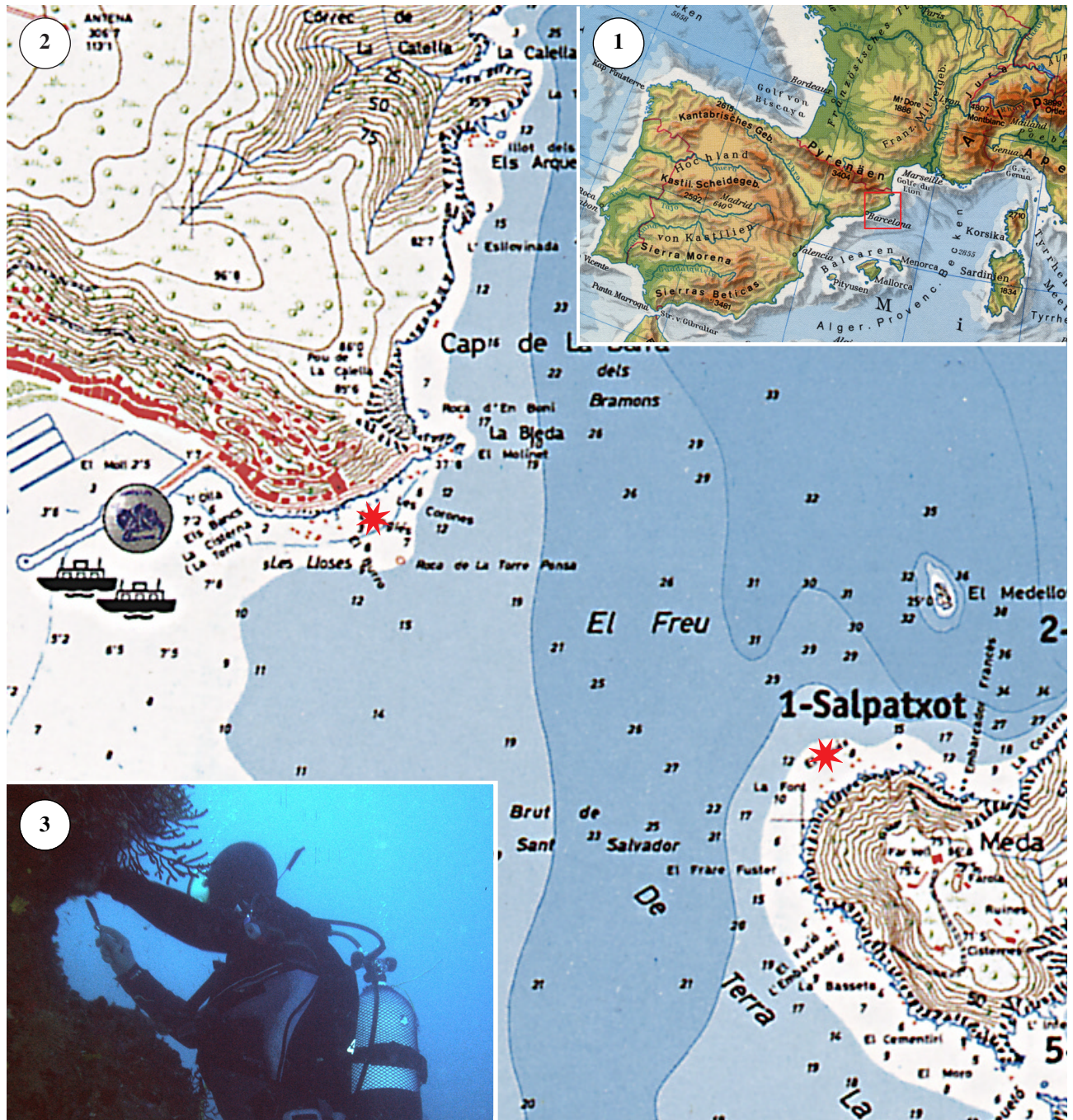
### 2.1 Beschaffung und Hälterung der Tiere

Der marine Lebensraum und das Verbreitungsgebiet von *C. dellechiaiei* (westliches Mittelmeerbecken, Bermudas, Australien, Japan) schränkt die Verfügbarkeit lebenden Materials für in Deutschland durchgeführte Untersuchungen leider stark ein (VAN NAME 1945, PÉRÈS 1956, MONNIOT 1972a).

Mehrmals wurde versucht, aus Spanien per Post Frischmaterial zu erhalten, allerdings scheiterte dies zumeist an Zollformalitäten: Die Pakete wurden unter Missachtung der Aufschriften wenig behutsam geöffnet, so dass durch Lecks in den Transportbehältern das Hälterungswasser auslief und die Tiere im Zustand fortschreitender Zersetzung in München ankamen. Nach diesen negativen Erfahrungen wurden die Beschaffung und der Transport persönlich übernommen. Zwei Sammelfahrten nach Spanien konnten für die vorliegende Arbeit durchgeführt werden. Pro Sammelfahrt wurden jeweils etwa 15–20 Kolonien für die mikroskopische Untersuchung gesammelt, weitere Kolonien waren für die Extraktion und Untersuchung der Inhaltsstoffe (durchgeführt von Dr. B. STEFFAN, Institut für Organische Chemie, LMU München) vorgesehen. Einige Kolonien wurden direkt vor Ort fixiert. Die übrigen Tiere wurden lebend nach München gebracht.

Im beprobten Gebiet (Nordostküste Spaniens, westliches Mittelmeerbecken, s. Tafel 6) existieren zwei Farbvarianten von *Cystodytes dellechiaiei*: Violette Kolonien sind relativ häufig und können im untersuchten Gebiet an vielen Tauchplätzen gefunden werden, vorausgesetzt, geeignetes Substrat (meist Felsen) ist vorhanden. Graugrüne Kolonien dagegen sind sehr selten und kommen nur an wenigen Stellen vor. Hinsichtlich der Wahl ihrer Standorte unterscheiden sich die beiden Farbvarianten des Probengebiets nicht voneinander: An den Tauchplätzen, an denen die seltenen graugrünen Kolonien zu finden waren, kamen stets auch violette Kolonien vor, teilweise wuchsen sie sogar direkt nebeneinander (Tafel 10, Abb. 4). Beide Farbvarianten besiedelten bevorzugt Standorte mit mäßiger bis starker Strömung auf senkrechten bzw. überhängenden Felsflächen und in Höhlen ab ca. 5 m Wassertiefe (Tafel 10, Abb. 1 und 2).





**Tafel 6**

Beschaffung der Tiere

1. Übersichtskarte Südwesteuropa (aus: DIERCKE Weltatlas, MAYER 1980; Rahmen: Lage des Probengebiets).
2. Detailkarte des Sammelgebiets (Nähe Islas Medas, Spanien). Wichtige Sammelstellen sind mit einem Stern gekennzeichnet (aus: Werbeprospekt der Tauchbasis Unisub, T. MURRAY).
3. Die Kolonien wurden mit Hilfe von Tauchgerät und Tafelmesser vom Substrat abgelöst.

Zur Beschaffung der Tiere wurde zunächst nur mit Schnorchel und Maske getaucht. Da jedoch die Entfernung der Tiere vom Substrat mit äußerster Vorsicht und entsprechend langsam erfolgen musste, um die Kolonien nicht zu verletzen, wurde bald dem Tauchen mit autonomem Leichttauchgerät (= *Scuba*) der Vorzug gegeben. Dies ermöglichte natürlich viel längere Aufenthalte unter Wasser und somit effektivere Sammelarbeit, sowie die parallele Aufnahme von Umgebungsparametern (Tiefen- und Temperaturmessung, Unterwasserfotografie) direkt am Sammelort. Außerdem konnten so auch Tiere in größeren Tiefen (bis ca. 40 m) und in Höhlen gesammelt werden.

Die Entfernung der Kolonien vom Substrat erfolgte mit Hilfe eines stumpfen Tafelmessers bzw. eines rundgeschliffenen Malerspachtels (Tafel 6, Abb. 3). Das Werkzeug wurde flächig unter die Kolonie geschoben und die Kolonie dann vorsichtig im Ganzen abgelöst. Da sehr große Kolonien nicht unverletzt vom Substrat getrennt werden konnten, wurden bevorzugt kleine und mittelgroße Kolonien gesammelt. Nur gelegentlich wurde eine größere Kolonie mitgenommen und mit Hilfe eines mitgeführten Mikroskops noch in Spanien untersucht. Außerdem wurde darauf geachtet, nur Kolonien zu sammeln, die auf Steinen bzw. stark verkalkten Algen wuchsen, da Schwämme und andere weiche Substrate bei Transport und Hälterung leicht verderben und somit die Wasserqualität der Aquarien massiv verschlechtern.

In diesem Sinne erfolgte bereits unter Wasser eine Vorauswahl der Kolonien. An Bord des Tauchbootes wurden die Kolonien dann in Plastikkanistern mit viel frischem Wasser versorgt und während des Transports nach Deutschland möglichst kühl gehalten. Zwei der etwa 20 für diese Arbeit nach München transportierten Kolonien gehörten der graugrünen Farbvariante an, die übrigen Kolonien waren violett.

Zur Hälterung standen in München zwei Aquarien (Volumen je 30 l) mit Durchflussskühlung, Filter und Belüftung zur Verfügung. Die Wassertemperatur der Aquarien entsprach mit 16–17 °C etwa der mittleren Wassertemperatur am Sammelort. Zur Befüllung der Aquarien wurde frisches Wasser vom Standort bzw. sukzessive künstliches Meerwasser (hergestellt mit ca. 35 ‰ BioMarin®–Meersalzmischung, Fa. BioMarin) entsprechender Dichte verwendet. Behutsam transportierte Tiere konnten in München mehrere Monate gehältert werden. Die Ascidien wurden 1x wöchentlich mit flüssigem Futterkonzentrat (Invertamin®, Fa. Tetra bzw. Liquifry marine®, Fa. Interpet) gefüttert. Um zu prüfen, ob die Tiere bei geschlossenen Ein- bzw. Ausströmöffnungen noch Nahrung aufnehmen, wurde das Futterkonzentrat zum Teil mit Nilblausulfat bzw. Ölrot angefärbt.

## 2.2 Betäubung der Tiere

Die Untersuchung der Zooide koloniebildender Ascidien wird durch deren starke Kontraktionsfähigkeit sehr erschwert: Bereits bei Berührung der Kolonien ziehen sich die Zooide sofort zusammen und stoßen Wasser aus (= „squirting“, daher der englische Name „sea squirts“ für Ascidien). In kontrahiertem Zustand lassen sich aber viele Merkmale der Zooide, die für die korrekte Bestimmung und die morphologische Untersuchung der Ascidien



festgehalten werden müssen, nicht deutlich erkennen (bei *Cystodytes dellechiaiei* ist die taxonomische Bestimmung allerdings auch über die Kalkschuppen in den Kolonien möglich). Deshalb wurde der Versuch unternommen, die Zooide von *C. dellechiaiei* mit für marine Wirbellose üblichen Betäubungslösungen zu relaxieren. Während diese Verfahren bei solitären Ascidien häufig gut funktionieren, lassen sich Zooide koloniebildender Ascidien häufig nur schlecht bis überhaupt nicht relaxieren (MONNIOT und MONNIOT 1972, RIEDL 1983, eigene Beobachtungen an 12 verschiedenen Ascidienarten).

Folgende Lösungen wurden verwendet:

- Betäubungslösung 1:  
ca. 7 % wässrige  $MgCl_2$ -Lösung, Dichte aräometrisch an Habitatwasser angeglichen (nach RIEDL 1983)
- Betäubungslösung 2:  
4 Tropfen gesättigte, ethanolische Menthollösung auf 100 ml Habitatwasser (nach ABDEL-MALEK 1951)

Diese Verfahren hatten jedoch keinerlei Auswirkungen auf die Zooide von *C. dellechiaiei*, so dass auf diese Behandlung bald verzichtet wurde, um zusätzliche Artefaktquellen auszuschließen. Für die Untersuchung der Zooide wurden die lebenden Kolonien stattdessen langsam auf etwa 4 °C heruntergekühlt. Dies verlangsamte die Kontraktion der Zooide etwas.

## 2.3 Gewinnung von Zooiden und Larven

Die Zooide von *Cystodytes dellechiaiei* ließen sich relativ unverletzt aus den Zooidhohlräumen entfernen, da sie (im Gegensatz zu den Zooiden vieler anderer koloniebildender Ascidien) offensichtlich nicht großflächig mit der Tunikamatrix verwachsen sind. Die Isolierung der Zooide erfolgte mit Hilfe einer abgestumpften Präpariernadel unter dem Stereomikroskop (STEMI SV 8, Fa. Zeiss mit Beleuchtungseinrichtung 1500-Z und flexiblem Lichtleiter). Zunächst wurden die Kolonien längs in etwa 2–3 mm dicke Scheiben geschnitten, so dass einige Zooidkapseln angeschnitten und damit geöffnet wurden. Dann wurde die Präpariernadel von unten (posterior) her in einen Zooidhohlraum eingeführt und das Zooid mit einer nach oben (anterior) geführten Bewegung herausgeschoben (s. Tafel 7, Abb. 1).

Bei der Präparation violetter Kolonien wurden nach dem Aufschneiden der Kolonie im Inneren der Zooidhohlräume gelegentlich Larven sichtbar. Die Larven wurden mit Hilfe einer Präpariernadel unter stereomikroskopischer Kontrolle aus den Zooidhohlräumen entfernt. Zooide und Larven wurden nach der Entfernung aus den Kolonien sofort mikroskopiert (Lichtmikroskop), beziehungsweise im Ganzen fixiert und für die Rasterelektronenmikroskopie (Methode nach TANAKA, s. Abschnitt 2.7.2) und die Transmissionselektronenmikroskopie (s. Abschnitt 2.8) präpariert.

## 2.4 Gewinnung von Tunikaflüssigkeit und Zooidpreßsaft

Zur Gewinnung von Tunikaflüssigkeit wurde eine abgetrocknete Kolonie vorsichtig mit einer fein ausgezogenen Pasteurpipette angestochen und aus den oberen Tunikaschichten austretende Flüssigkeit abgesaugt (Tafel 7, Abb. 2). Dabei wurde darauf geachtet, die unteren, zooidhaltigen Bereiche der Tunika nicht zu verletzen, um eine Vermischung der Tunikaflüssigkeit mit Zooidbestandteilen und Lösungsprodukten von Kalkschuppen zu vermeiden. Anschließend wurde die Tunikaflüssigkeit sofort weiter verwendet (Präparation für REM / EDX, Osmolalitätsmessung, Sulfat- und Chloridtest, pH-Messung).

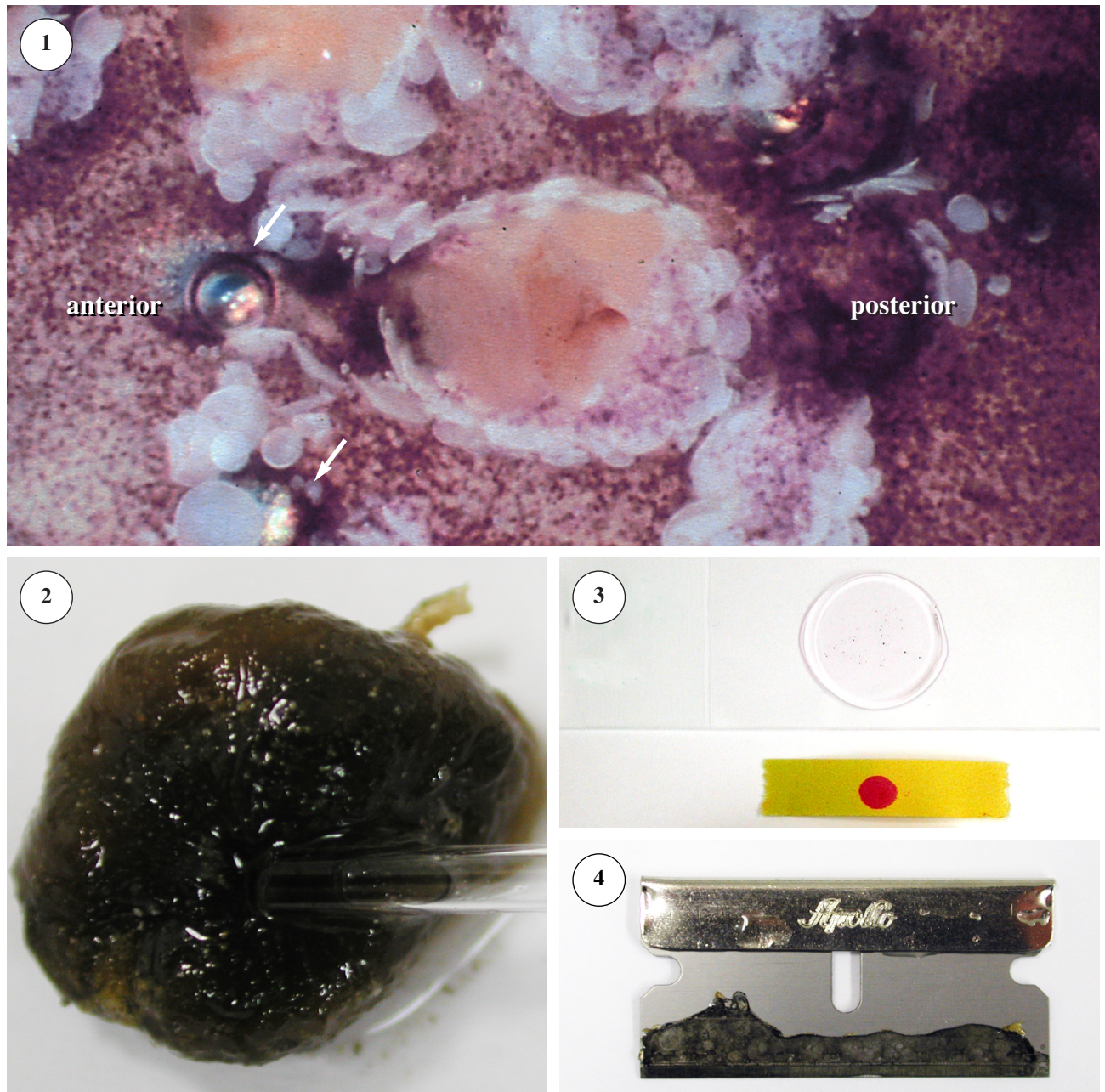
## 2.5 Auswahl einer geeigneten Fixierungslösung

Um Proben für einen längeren Zeitraum verfügbar zu machen und für nachfolgende mikroskopische Untersuchung zu stabilisieren, wurden Gewebestücke fixiert, entwässert und in Paraffin bzw. Kunstharz eingebettet.

Als Standardpuffer für die Fixierung wird in der Arbeitsgruppe routinemäßig 75 mM Cacodylatpuffer mit 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,0) verwendet. Wegen der hohen Osmolarität der natürlichen Umgebung von *C. dellechiaiei* (Meerwasser mit ca. 3,5 % Salzgehalt, 1 Osmol/l, s. TARDENT 1993, CAMPBELL 1997) wurde diesem Standardpuffer noch 2,5 % Natriumchlorid zugefügt.

Nachdem die Messergebnisse von pH-Wert und Osmolalität der Tunikaflüssigkeit vorlagen, wurde die Osmolarität und die Pufferkapazität des Fixierungspuffers nochmals erhöht. Schließlich wurde für die meisten Proben 140 mM Cacodylatpuffer mit 2 mM  $\text{MgCl}_2$  und 2,5 % NaCl (pH 7,0) verwendet. Dieser Puffer konnte auch für viele andere marine Invertebraten, die in der Arbeitsgruppe bearbeitet werden, erfolgreich eingesetzt werden.

Die Fixierung erfolgte mit 2,5 % Glutaraldehyd (EM grade, Fa. PLANO) im Fixierungspuffer. Das Fixativ wurde jeweils unmittelbar vor der Verwendung angesetzt. Glutaraldehyd senkt den pH-Wert ungepufferter Lösungen, daher wurde vor der Verwendung der pH-Wert des Fixierungsgemischs kontrolliert, um die Wirkung des Fixierungspuffers zu überprüfen. Die Proben wurden größtenteils bereits im Fixativ zerteilt und geschnitten, um Veränderungen des Materials möglichst frühzeitig entgegenzuwirken.

**Tafel 7****Gewinnung von Zooiden und Tunikaflüssigkeit**

1. Die gelben Zooide wurden aus aufgeschnittenen Kolonien von posterior nach anterior herausgeschoben. Beim Aufschneiden der Kolonien bilden sich sofort Gasbläschen (Pfeile).
2. Tunikaflüssigkeit wurde durch Anstechen mit einer Pipette gewonnen. Tunikaflüssigkeit dieser abgestorbenen, braun verfärbten Kolonie wurde mit der Tunikaflüssigkeit aus frischen violetten Kolonien verglichen.
3. Messung des pH-Wertes von Tunikaflüssigkeit aus einer violetten Kolonie. Aufgrund des geringen Probenvolumens wurde der pH-Wert durch Auftropfen auf pH-Papier ermittelt.
4. Korrodierte »Apollo«-Klinge nach Präparation von Tunikaproben (ca. 5 min nach Präparationsbeginn).

## 2.6 Lichtmikroskopie

### 2.6.1 Präparation unfixierter Gewebeproben für die Lichtmikroskopie

#### Herstellung von Handschnitten

Für die Lichtmikroskopie von Frischmaterial (unfixierte Gewebeproben) wurden mit Hilfe von gereinigten Rasierklingen Handschnitte durch die Kolonien von *C. dellechiaiei* angefertigt. Da das Tunikamaterial allerdings aufgrund seiner weich-elastischen Konsistenz und der eingelagerten, harten Kalkschuppen sehr schlecht schneidbar ist, konnten bestenfalls Schnitte von ca. 100–300 µm Dicke hergestellt werden. Neben der schlechten Schneidbarkeit war das zweite Hauptproblem bei der Präparation von Frischmaterial der massive Säuregehalt der Blaszellen (ca. pH 1,5; s. Tafel 7, Abb. 3). Beim Anschneiden der Kolonien trat sofort Säure aus und verursachte innerhalb von wenigen Minuten starke Korrosion am Präparierbesteck sowie an den Messerklingen (s. Tafel 7, Abb. 4). Kalkstrukturen innerhalb der Tunika wurden rasch aufgelöst. Da jedoch eine Untersuchung der Pigmentzellen unter *in situ*-Bedingungen erfolgen sollte, wurde in diesem Falle auf den Einsatz von Pufferlösungen verzichtet, um die rote bzw. gelbgrüne Farbe der Pigmentzellen möglichst lange zu erhalten. Zur Vermeidung der Korrosion wurde später teflonbeschichtetes Präparierbesteck (Fa. Roth) verwendet.

Die beste Technik zur Gewinnung verwendbarer Handschnitte war die Herstellung sehr flacher Gewebekeile, die an den Enden dünn ausliefen und an diesen Stellen mikroskopisch untersucht werden konnten. Die relative Transparenz der Tunikamatrix und der Blaszellen gestattete trotz hoher Schnittdicken eine lichtmikroskopische Untersuchung des Gewebes. Probleme entstanden aber bei der Verwendung von hoch vergrößernden (Immersions-) Objektiven am Lichtmikroskop: Diese Objektive haben einen sehr geringen Arbeitsabstand, wodurch die Platzierung dickerer Gewebekeile auf dem Objektisch schwierig wird.

#### Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Gewinnung dünnerer Schnitte unfixierten Materials wurden Gefrierschnitte mit Hilfe einer Kühleinrichtung (Frigomobil, Fa. Reichert–Jung) am Rotationsmikrotom (Modell 2040, Fa. Reichert–Jung) hergestellt. Zum Schneiden wurden Stahlmesser mit C-Schliff (Fa. Reichert–Jung bzw. Fa. Leica) verwendet. Die besten Ergebnisse lieferte Material, das vor dem Schneiden in eine zuckerhaltige Gefrierschutzlösung (*Tissue freezing medium*, Fa. Reichert–Jung, 1:1 mit künstl. Meerwasser verdünnt) eingelegt, anschließend eingefroren und mit einer stabilen Rasierklinge auf eine Schnittfläche von etwa 3 mm Kantenlänge zurechtgetrimmt wurde. Die optimale Schneidetemperatur lag bei etwa –12 °C, die minimale routinemäßig erreichbare Schnittdicke war 40 µm. Dünnere Schnitte (20–30 µm) waren sehr instabil und zerbrachen oft schon beim Transfer auf den Objektträger. Die Schnitte wurden gefroren mit einer gekühlten Pinzette auf gekühlte Super Frost® Plus-Objektträger (beschichtete Objektträger zur Verbesserung der Probenhaltung, Fa. Roth) aufgebracht und durch leichtes Erwärmen auf dem Handrücken gestreckt. Anschließend wurden die Schnitte sofort mikroskopiert bzw. mit Färbelösungen inkubiert. Der bei der Präparation von Gefrierschnitten übliche Trocknungsschritt wurde ausgelassen, um Schrumpfungen im Gewebe und übermäßige Bildung von Salzkristallen zu vermeiden. Dies hatte allerdings den Nachteil, dass die Schnitte nur sehr

schwach an den Objektträgern hafteten und daher nur waagerecht transportiert und inkubiert werden konnten.

### **Histochemische Analyse unfixierter Schnitte**

Für einige histochemische Untersuchungen wurde unfixiertes (d.h. nicht durch Glutaraldehyd stabilisiertes und anschließend entwässertes) Tunikamaterial benötigt. Hierzu wurden Gefrierschnitte oder Handschnitte auf Super Frost® Plus-Objektträger (Fa. Roth) aufgezogen, mit den jeweiligen Lösungen überschichtet und flach liegend inkubiert. Ein Einstellen der Objektträger in eine Färbeküvette mit den jeweiligen Inkubationslösungen wurde bei Frischmaterial-Schnitten vermieden, da die Schnitte sich leicht von den Objektträgern lösten und verloren gingen. Auch bei flacher Inkubation der Schnitte kam es häufig zu Verlusten, aus diesem Grund wurden nur die Enzymbehandlungen, die Vitalitäts- und pH-Tests und die Lipidfärbung an Gefrier- oder Handschnitten durchgeführt. Für weitere histochemische Untersuchungen konnte fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material verwendet werden.

### **Enzymatischer Verdau von Tunikamaterial**

Zur Aufklärung der Bestandteile der Tunikamatrix wurden Tunikaschnitte mit Proteinase K [1 % in 75 mM Cacodylatpuffer (mit 2 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7,0)] oder Cellulase [2,5 % in Lyasepuffer (75 mM KCl und 7,5 mM EDTA; pH 4,5)] behandelt (Cellulase: Fa. Serva, Proteinase K: Fa. Sigma). Nach 2 h und nach 24 h im Wärmeschrank (30 °C für Cellulaseverdau, 37 °C für Proteinase K-Verdau) wurden die Schnitte mikroskopisch untersucht.

In weiteren Versuchen wurden beide Enzyme miteinander kombiniert. Durch die mechanische Belastung beim Spülen und Mikroskopieren (Aufbringen und Abnehmen von Deckgläsern und Lösungen) wurden jedoch alle Gefrier- und Handschnitte stark geschädigt. Aus diesem Grund wurden für die kombinierten Verdauungsversuche (Cellulase und Proteinase K) Paraffinschnitte von fixiertem Material eingesetzt.

Kombination 1:

Cellulase (24 h, 30 °C), danach Proteinase K (24 h, 37 °C)

Kombination 2:

Proteinase K (24 h, 37 °C), Spülen der Schnitte mit Lyasepuffer (zur Entfernung der Proteinase K, da sonst evtl. Inaktivierung der Cellulase !), Cellulase (24 h, 30 °C)

Anschließend wurden die Schnitte in künstlichem Meerwasser mikroskopiert. Als Kontrollen für alle Versuche wurden Schnitte in künstlichem Meerwasser bzw. in den für die Enzyme verwendeten Puffern inkubiert.

### **Auflösung von Tunikamaterial mit celluloselösenden Reagenzien**

Da bei vielen Ascidien Cellulose eine wichtige Rolle beim Aufbau der Tunika spielt, wurde versucht, durch Auflösungsversuche mit verschiedenen Lösungsmitteln Cellulose in der Tunika von *C. dellechiaiei* nachzuweisen. Die verwendeten Lösungsmittel waren:

1. Konzentrierte Lösung von Xanthogenat (Fa. Sigma)
2. Calciumrhodanid in Pulverform (hergestellt von Dr. FORMANEK, Botanisches Institut)

Ähnliche Stoffe werden in der Kunstseideproduktion verwendet, um aus Holz Cellulose zu gewinnen und zu verspinnen. Beide Substanzen sind chaotrope Salze, die die kristalline Fibrillenstruktur der Cellulose zerstören und dadurch lösend wirken.

Darüber hinaus wurde versucht, das Tunikamaterial durch Kochen in konzentrierter Natronlauge, konzentrierter Schwefelsäure oder 100% Trifluoressigsäure aufzulösen.

### Vitalitätstests

Da die Kolonien sich durch Transport und Hälderung veränderten (Verschluß der Tunikakanäle, s. Abschnitt 3.2.2) und offensichtlich die Nahrungsaufnahme einstellten, erschien es notwendig, die Vitalität der verwendeten Kolonien zu überprüfen. Die Vitalität der Zooide wurde durch Lebendmikroskopie bestätigt (s. Abschnitt 3.2.2 und Tafel 23). Die Vitalität der Tunikagewebe wurde mit Hilfe von spezifischen Farbstoffen nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurden Handschnitte von fixiertem Material bzw. Tiefkühlmaterial mit den Fluorochromen versetzt und mikroskopiert.

- **Färbung von Kern und Cytoplasma mit Acridinorange**

Auch mit Acridinorange ist eine fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung von lebenden und abgestorbenen Zellen möglich: lebende Zellen zeigen mit Acridinorange eine Grünfluoreszenz der Kerne und eine deutlich begrenzte partikuläre Orangefluoreszenz der Lysosomen. In geschädigten oder abgestorbenen Zellen fluoreszieren die Zellkerne gelbgrün, die Nukleolen rot und die partikuläre Fluoreszenz der Lysosomen wird durch diffuse Orangefluoreszenz des Cytoplasmas ersetzt. Zur Färbung wurden 10 mg Acridinorange zunächst in 1 ml HANK's Balanced Salt Solution (BSS, Herstellung s. Tabelle 3) gelöst und der pH-Wert der Lösung auf 7,3 eingestellt (BÖCK 1989). Anschließend wurde die Lösung noch 1:10x mit BSS verdünnt und der pH-Wert nochmals überprüft. Zur Färbung wurden Handschnitte zunächst kurz in BSS gespült und dann 5 min mit der Acridinorangefärbung überschichtet. Dann wurden die Schnitte nochmals vorsichtig mit BSS gespült und in frischer BSS mikroskopiert.

### Tabelle 3

*Herstellung von HANK's Balanced Salt Solution (= standardisierte BSS)*

*(nach BÖCK 1989)*

Substanz	g/l
NaCl	8,00
KCl	0,40
CaCl <sub>2</sub>	0,14
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,10
MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0,10
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,06
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06
Glucose	1,00
Phenolrot	0,02
NaHCO <sub>3</sub>	0,35



- **Färbung des Cytoplasmas mit Fluoresceindiacetat**

Der Vitalitätsnachweis mit Fluoresceindiacetat (Fa. Sigma) beruht auf einem einfachen Prinzip: Fluoresceindiacetat (nicht fluoreszierend) kann durch intakte Plasmamembranen in Zellen eindringen, ohne die Zellmembran zu zerstören und wird im Cytoplasma sofort durch dort vorhandene Esterasen zerlegt. Das fluoreszierende Reaktionsprodukt, Fluorescein, ist polar und kann daher intakte Zellmembranen nicht durchdringen. Fluoreszenz kann in diesem Falle nur im Cytoplasma der betreffenden Zellen beobachtet werden. Ist die Zellmembran jedoch beschädigt, tritt Fluorescein wieder aus der Zelle aus und es kommt zu einer diffusen Fluoreszenz der Zellen und ihrer extrazellulären Umgebung. Auf diese Weise lassen sich lebende Zellen fluoreszenzmikroskopisch von abgestorbenen Zellen unterscheiden.

Färbevorgang (nach BÖCK 1989):

Zunächst wurde eine Stammlösung von 1 mg Fluoresceindiacetat in 1 ml Aceton p.a. hergestellt. Diese Lösung ist im Kühlschrank mehrere Monate haltbar. Die Stammlösung wurde 1:1000 mit künstlichem Meerwasser bzw. HANK's Balanced Salt Solution (s. Acridinorangefärbung) verdünnt angewendet. Zur Färbung wurden Handschnitte, die sowohl Zooid- als auch Tunikagewebe enthielten, mit der verdünnten Farbstofflösung überschichtet. Nach wenigen Minuten wurden die Schnitte in der Farbstofflösung mikroskopiert (Anregungswellenlänge: 365 nm).

### **Fluoreszenzfärbung mit Lyso™ Sensor Blue**

Zum direkten Nachweis der Säuren in Blasen- und Pigmentzellen wurde der pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoff Lyso™ Sensor Blue DND-167 (Fa. Molecular Probes) verwendet. Dieser Farbstoff fluoresziert nur in sauren Zellkompartimenten (ab ca. pH 5) und reichert sich dort an.

Gefärbt wurde mit 1 µmol und 10 µmol Lyso™ Sensor in künstl. Meerwasser. Die Schnitte wurden nach 30 min und nach 180 min Inkubation (feuchte Kammer, Zimmertemperatur, Dunkelheit) mit einer Anregungswellenlänge von 365 nm (UV-Anregung) mikroskopiert.

### **Lipidfärbung mit Ölrot O**

Zur Darstellung von Lipiden in der Tunika wurde eine Lipidfärbung mit Ölrot O durchgeführt. Bei den gängigen Lipidfärbungen, so auch bei der hier angewendeten Methode, löst sich der Farbstoff in den Lipidanteilen der Gewebe besser, als im für die Färbelösung verwendeten Lösungsmittel, so dass es zu einer Anreicherung des Farbstoffs in den lipidhaltigen Gewebeteilen kommt.

Stammlösung:

0,5 g Ölrot O wurden in 100 ml Isopropanol p.a. gelöst.

Gebrauchslösung:

60 ml der Stammlösung wurden mit 40 ml destilliertem H<sub>2</sub>O gemischt, nach 24 h wurde die Lösung filtriert und war danach gebrauchsfertig.

**Inkubation:**

Die Schnitte wurden 10 min bei Raumtemperatur mit der Ölrotlösung überschichtet. Anschließend wurde die Färbelösung abgesaugt. Die Schnitte wurden mit künstlichem Meerwasser nachgespült.

**Cellulosefärbung mit Chlorzinkjod-Lösung**

Chlorzinkjodlösung dient als Färbereagenz für reine Cellulose und wird daher vor allem zur Kontrastierung von pflanzlichen Zellwänden verwendet. Cellulose färbt sich bei Behandlung mit der Lösung blauviolett.

**Herstellung der Färbelösung (NULTSCH 1995):**

50 g Zinkchlorid und 16 g Kaliumjodid wurden in 17 ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde bis zur Sättigung Jod zugegeben. Die Lösung wurde im Dunkeln aufbewahrt (braune Flasche).

**Färbung:**

Frische Handschnitte von Tunikamaterial wurden mit der Lösung überschichtet und darin mikroskopiert.

**Mikroskopie der unfixierten Schnitte**

Gefärbte und ungefärbte Hand- bzw. Gefrierschnitte wurden in gekühltes künstliches Meerwasser transferiert. Die Untersuchung der Schnitte erfolgte im Zeiss Axiophot Lichtmikroskop im Hellfeld, Differentiellen Interferenzkontrast und Phasenkontrast sowie mit Auflichtfluoreszenz.

Geräteparameter Lichtmikroskop Axiophot (Fa. Zeiss):

Objektive: Plan-Neofluar 10x/0,30–40x/0,75–100x/1,30 (mit Ölimmersion);

Variotubus Optovar zur Nachvergrößerung 1,25x, 1,6x und 2,0x;

Fluoreszenz-Anregungswellenlängen 546 nm (grün), 450–490 (blau), 365 (UV);

50 W Quecksilberdampflampe

Für die Untersuchung von schwächeren Fluoreszenzerscheinungen wurde außerdem ein weiteres Lichtmikroskop (Typ Axioplan, Fa. Zeiss) mit 100 W Quecksilberdampflampe und Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung eingesetzt [Anregungswellenlängen: 365 nm (UV); 485 (blaugrün); 546 nm (grün)].

**2.6.2 Präparation von Paraffinschnitten für die Lichtmikroskopie****Fixierung und Einbettung**

Zur Einbettung in Paraffin wurden zunächst mit einer entfetteten Rasierklinge 0,3–0,5 cm große Würfel aus Kolonien von *C. dellechiaiei* herausgeschnitten. Hierbei wurden Proben aus den verschiedenen Tunikabereichen (oberflächennah, zooidnah, substratnah) entnommen. Die Fixierung erfolgte in 2,5 % Glutaraldehyd im Fixierungspuffer (s. 2.5) auf einem Schüttler. Anschließend wurden die Proben 3x in Fixierungspuffer gewaschen. Ein kleiner Teil der Gewebestücke wurde in 1 % Osmiumtetroxid (in Fixierungspuffer) nachfixiert und



kontrastiert, um Paraffinschnitte auch für die Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop verfügbar zu machen. Alle Proben wurden dann 3x in destilliertem Wasser gewaschen und in aufsteigender Acetonreihe (10 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 3x 100 % Aceton p.a., verdünnt mit dest. H<sub>2</sub>O) entwässert. Anschließend wurden die Proben über Isopropanol p.a. in 100 % Benzol p.a. überführt.

Im Verlauf der Arbeit wurden verschiedene Ersatzmittel für das gesundheitsschädliche Benzol getestet (Toluol p.a, Xylol p.a, Butylacetat p.a, Roti<sup>®</sup>histol). Roti<sup>®</sup>histol, ein aus Orangenschalen gewonnenes Lösungsmittel unbekannter Zusammensetzung (Verfahren und Vertrieb Fa. Roth) stellte sich schließlich als geeigneter Ersatz für Benzol heraus und wurde für die in jüngerer Zeit fixierten Proben verwendet. Als Intermedium zwischen dem letzten Acetonschritt und Roti<sup>®</sup>histol ist jedoch 100 % Ethanol dem Isopropanol vorzuziehen, da es sich wesentlich besser mit Roti<sup>®</sup>histol mischt. Aus dem reinen Benzol (bzw. Roti<sup>®</sup>histol) wurden die Proben in ein 1:1-Gemisch von Benzol (bzw. Roti<sup>®</sup>histol) und geschmolzenem Paraffin (Roti<sup>®</sup>plast, Fa. Roth) überführt und für mindestens 2 h in den Wärmeschrank (60 °C) gestellt. Zum Schmelzen und einfachen Dosieren des flüssigen Paraffins wurde ein Paraffinspender (Modell EG 1120, Fa. Leica) mit geheiztem Auslaßhahn und Wärmeplatte verwendet.

Anschließend wurde das Lösungsmittel-Paraffin-Gemisch entfernt und die Proben in 100 % Paraffin verbracht. Nach 8–24 h wurde das Paraffin durch Ausgießen entfernt und die Proben noch einmal mindestens 24 h in frischem Paraffin im Wärmeschrank inkubiert, um eventuelle Reste von Benzol (bzw. Roti<sup>®</sup>histol) zu entfernen.

Zur Einbettung wurden die Proben auf der Wärmeplatte des Paraffinspenders bei 60 °C in kubische Silikonformen (Fa. Roth) gelegt, ausgerichtet und mit frischem Paraffin aufgefüllt. Vor dem Erstarren des Paraffins wurden nummerierte Etiketten am Rand des Blöckchens eingelegt, um eine spätere Identifizierung der Proben zu ermöglichen. Die Abkühlung der Blöckchen erfolgte in einem Eisbad.

Die etwa würfelförmigen Probenblöckchen wurden nach vollständiger Erstarrung aus den Formen gedrückt und mit Hilfe einer stabilen Rasierklinge pyramidenförmig getrimmt. Dadurch wurde die Schnittfläche auf ca. 0,6 cm x 0,6 cm reduziert.

### **Herstellung von Schnittpräparaten**

Paraffinschnitte von 10 µm Dicke wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (Modell 2040, Fa. Reichert-Jung) mit Einweg-Stahlklingen angefertigt und in einem Tropfen Ampuwa<sup>®</sup> (gereinigtes destilliertes Wasser, Fa. Fresenius) auf Super Frost<sup>®</sup>Plus-Objektträger (Fa. Roth) aufgelegt.

Von den meisten Präparaten wurden Schnittserien hergestellt, um einen dreidimensionalen Einblick in die Gewebe zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden die Serienschnitte immer in der gleichen Reihenfolge auf dem Objektträger positioniert. Dadurch war die Lage der Schnitte im Gewebe jederzeit nachvollziehbar. Der erste Schnitt wurde immer unten links auf den Objektträger gebracht. Die nachfolgenden Schnittbänder wurden rechts davon posi-

tioniert, so daß der letzte Schnitt jedes Serienpräparats oben rechts zu liegen kommt (s. Tafel 8, Abb. 1).

Die Objektträger wurden anschließend für ca. 1 h bei etwa 35 °C in den Wärmeschrank oder auf eine Wärmeplatte gelegt, hierbei werden die durch das Schneiden gestauchten Schnitte gestreckt und am Objektträger angetrocknet. Anschließend wurde das Paraffin von den Schnitten entfernt (2–3 Portionen Benzol bzw. Roti<sup>®</sup>histol in Färbeküvetten, jeweils mindestens 2 h).

Die so erzeugten Schnittserien wurden zum Teil ungefärbt verwendet (Eindeckmedien: Merckoglas<sup>®</sup>, Fa. Merck bzw. Entellan<sup>®</sup>, Fa. Merck, Deckgläser: 24 mm x 30 mm), der weitaus größere Teil wurde jedoch gefärbt und anschließend eingedeckt.

### **Serienschnitte für Auszählung der Zellhäufigkeiten**

Zur Abschätzung der Zellhäufigkeiten in verschiedenen Tunikabereichen der Kolonien wurden zunächst vier Meßfelder in der Tunika bestimmt, die jeweils einen Tunikabereich repräsentieren (s. Tafel 8). Von diesen Meßfeldern wurden Tunikaprobe entnommen, fixiert, in Paraffin eingebettet und (aus Sicht der Zooidposition) längs geführte Serienschnitte hergestellt.

Jeweils neun Serienschnitte wurden auf einem Objektträger aufgezogen. Zur Auszählung der Zellhäufigkeiten wurde jeweils nur der erste Schnitt eines Serienpräparats verwendet, so daß die ausgezählten Schnitte aus verschiedenen Gewebeschichten stammten. Durch diese Vorgehensweise konnten Doppeltzählungen von Zellen ausgeschlossen werden (s. Tafel 8, Abb. 1)

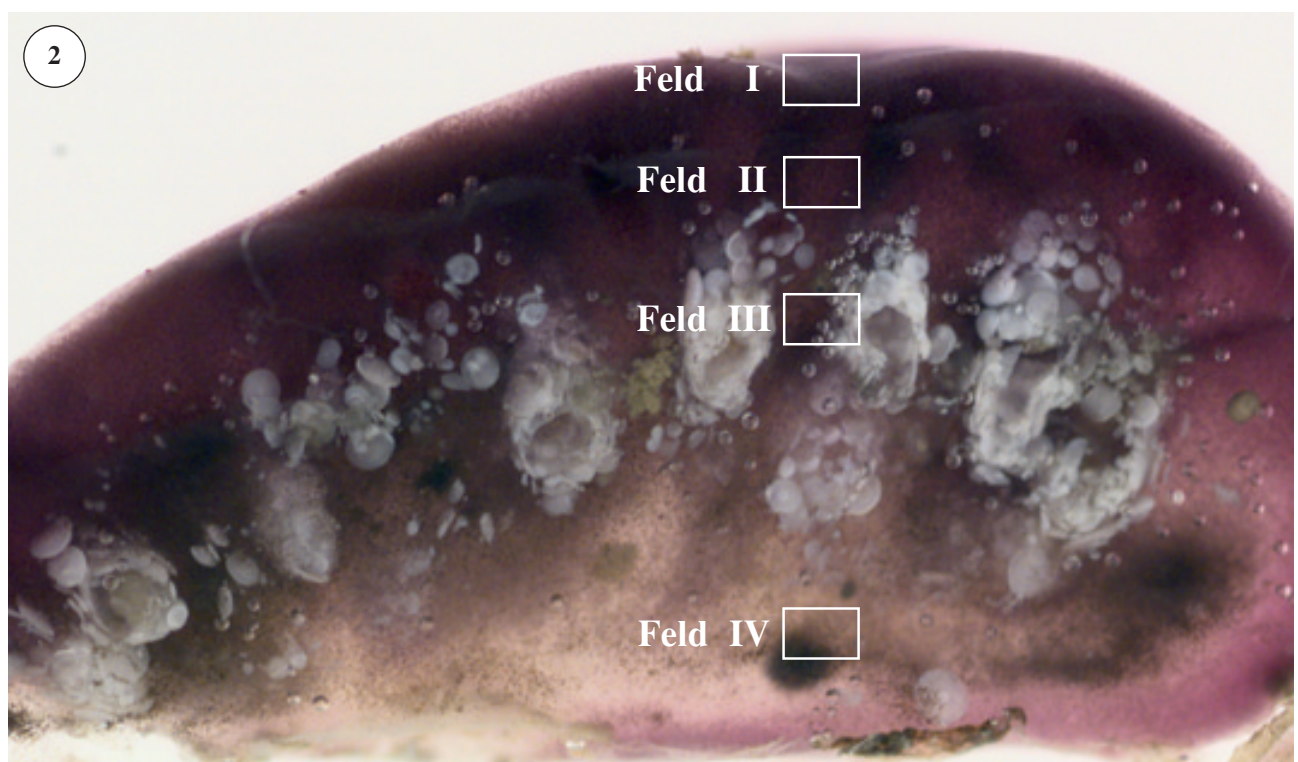
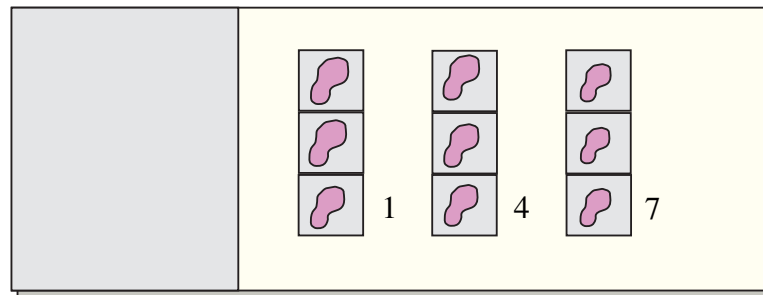
### **Färbung von Paraffinschnitten**

Für kontrastverbessernde oder histochemische Färbungen fixierten Materials wurden auf Super Frost<sup>®</sup>Plus-Objektträger aufgezogene Schnittserien entparaffiniert (siehe oben) und in Standküvetten (Fassungsvermögen ca. 120 ml) mit den jeweiligen Lösungen eingestellt. Anschließend wurden die Schnittpräparate eingedeckt (siehe oben) und nach dem Aushärten des Eindeckmittels mikroskopiert.

### **Hämatoxylin–Eosinfärbung**

Die Kombinationsfärbung mit Hämatoxylin und Eosin ist eine vor allem in der Histologie häufig angewendete Methode zur Kontrastierung von Geweben für die Lichtmikroskopie (BÖCK 1989). Es kommt dabei zu einer Blaufärbung basophiler Zellelemente (z.B. Zellkerne) durch Hämatoxylin. Acidophile Zellbestandteile (z.B. Cytoplasma) werden durch Eosin rosa bis kräftig rot gefärbt. Wegen der großen Beliebtheit der Hämatoxylin–Eosinfärbung sind weit über 50 verschiedene Möglichkeiten zur Herstellung von Hämatoxylinlösungen bekannt (vgl. Stainsfile - online Resource for Histotechnologists). Da bei der Untersuchung der Tunika von *Cystodytes dellechiaiei* zunächst nachgewiesen werden sollte, ob es sich bei den in der Tunika vorkommenden Strukturen um Zellen handelt, wurde zunächst Wert darauf gelegt, eine eindeutige Kernfärbung auszusuchen.

1



### Tafel 8

#### Paraffin-Serienschnitte

1. Die Positionierung der Serienschchnitt-Bänder in Schnittreihenfolge auf Objektträgern ermöglicht die Rekonstruktion dreidimensionaler Zusammenhänge. Der erste Schnitt einer Serie wird unten links positioniert (1), weitere Bänder werden rechts davon auf den Objektträger aufgebracht. Der letzte Schnitt liegt nach vollständiger Bestückung des Objektträgers oben rechts (9).
2. Zur Erfassung der Zellverteilung in unterschiedlichen Regionen der Tunika wurden stellvertretend vier Tunikabereiche ausgewählt.
  - Feld I: Oberfläche mit Außenschichten
  - Feld II: Bereich oberhalb der Zooidebene
  - Feld III: Bereich zwischen den Zooiden
  - Feld IV: untere Tunikaschichten mit kompartimentierten Zellen (braune Bereiche)

Im Verlauf der Arbeit wurden mehrere Hämatoxylinfärbungen (nach WEIGERT, GROAT, DELAFIELD und MAYER; Anweisungen s. BÖCK 1989), außerdem Färbungen mit Säurefuchsin, Kristallviolett, Toluidinblau, Safranin und Orcein (alle s. BÖCK 1989) verglichen, um eine klare Abgrenzung der Zellkerne von den übrigen Zellbestandteilen zu erreichen (Vermeidung von Überfärbung, deutliche Anfärbung der Kerne, Nichtfärbung anderer Zellbestandteile).

Selektive Kernfärbung konnte nur mit einer der vier getesteten Hämatoxylinvarianten erreicht werden, daher wurde diese, die sog. saure Hämalanfärbung nach MAYER, den anderen Methoden vorgezogen. Diese Variante zeichnet sich durch sehr kontrastreiche klare Kernfärbung aus, Überfärbung kommt auch bei längerer Einwirkdauer der Farbstofflösung nicht vor. Außerdem ist die Lösung sofort nach der Herstellung gebrauchsfertig und kann monatelang verwendet werden. Als Kontrastfärbung (Anfärbung des Cytoplasmas) erwies sich eine leichte Eosinfärbung als gut geeignet.

*Herstellung der Färbelösungen (BÖCK 1989):*

- 0,5 g Hämatoxylin, 100 mg Natriumjodat ( $\text{NaJO}_3$ ) und 25 g Kalium–Aluminium–Sulfat (Kalialaun) werden in 500 ml dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst (blauviolette Lösung) und 0,5 g Zitronensäure sowie 25 g Chloralhydrat (Trichloracetaldehydhydrat, als Stabilisator) zugegeben. Die fertige Lösung ist dunkel–rotviolett.
- Eosinlösung  
0,1 % Eosin Yellow in dest.  $\text{H}_2\text{O}$

*Durchführung der Färbung:*

- Überführung der entparaffinierten Schnitte aus Benzol (bzw. Roti<sup>®</sup>histol) schrittweise in Wasser
- 3–8 min Färbung mit MAYER's Hämalan
- Spülen in dest.  $\text{H}_2\text{O}$  (2 Portionen)
- 10 min Bläuen in fließendem Leitungswasser (alkalisches Leitungswasser bewirkt Blaufärbung und Fixierung der Färbung)
- 15 min Färben in 0,1 % Eosinlösung  
(Überfärben ist hier sinnvoll, da durch die anschließenden Schritte wieder Eosin ausgewaschen wird)
- 1–5 min Auswaschen in Wasser
- Differenzieren in 80 % Ethanol
- 99 % Ethanol (2 Portionen, je 2 min)
- 3–5 min Xylol
- Eindecken der Schnittpräparate

### **Färbung mit SCHIFF'schem Reagenz (BÖCK 1989)**

Das SCHIFF'sche Reagenz dient zum Nachweis von Aldehyden.

#### *Herstellung der Färbelösung:*

0,5 g Pararosanilin werden in 15 ml 1N Salzsäure, 0,5 g Natriumdisulfit in 85 ml destilliertem Wasser gelöst. Beide Lösungen wurden vereinigt und bei Raumtemperatur 24 h stehengelassen. Danach wurden 0,3 g Aktivkohle zugegeben, 15 s kräftig geschüttelt und die Lösung anschließend filtriert. Die resultierende Lösung ist farblos transparent bis leicht gelblich.

#### *Durchführung der Färbung:*

Entparaffinierte Schnitte werden über eine absteigende Acetonreihe (100 %, 80 %, 60 %, 40 %, 20 %, 10 %) in Wasser gebracht. Zur Färbung wurde eine Färbeküvette mit SCHIFF'schem Reagenz gefüllt und die Schnitte darin 15 min gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in Sulfitwasser (200 ml destilliertes Wasser, 10 ml 1N Salzsäure, 10 ml 10 %ige Natriumdisulfitlösung) gebracht (3 Portionen, je 2 min) und 15 min in fließendem Leitungswasser gespült. Danach folgte die Entwässerung der Präparate in aufsteigender Acetonreihe, das Überführen in Isopropanol und das Eindecken in Entellan®.

### **PAS-Reaktion (BÖCK 1989)**

In der PAS-Reaktion (engl. *Periodic Acid SCHIFF Reaction*) werden verschiedene Polysaccharide, wie z.B. Cellulose und Glykogen, außerdem neutrale Proteo- und Glykosaminoglykane (= Mukopolysaccharide) angefärbt. Saure Proteoglykane und Glykosaminoglykane sind PAS-negativ. Durch Oxidation mit Perjodsäure werden Aldehydgruppen freigesetzt, die anschließend mit SCHIFF'schem Reagenz nachgewiesen werden können (HALE 1957, BÖCK 1989).

Zur Färbung wurden die entparaffinierten Schnitte in Wasser gebracht und zunächst 10 min in wässriger Periodsäurelösung (1 %) oxidiert. Danach wurde mit 3 Portionen destilliertem Wasser gespült und die SCHIFF-Reaktion wie oben beschrieben durchgeführt.

### **Färbung mit Alcianblau (BÖCK 1989)**

Alcianblaufärbung ist ein gängiges Verfahren zur Anfärbung saurer Mukopolysaccharide (LISON 1960) und wurde bereits erfolgreich zur Anfärbung und Analyse von Ascidien-gewebe eingesetzt (LAMBERT 1979, DE LEO 1981). Durch Verwendung von Farbstofflösungen unterschiedlicher pH-Werte (pH 2,5 bzw pH 1,0) kann zwischen sauren und sauren, sulfatierten Mukopolysacchariden unterschieden werden: Bei pH 1,0 wird die Dissoziation von Carboxylgruppen unterdrückt, so dass nur die Sulfatgruppen der Mukopolysaccharide angefärbt werden (BÖCK 1989).

- **Alcianblaufärbung bei pH 2,5**

Entparaffinierte Schnitte wurden in Wasser gebracht und 3 min in 3 % Essigsäure eingestellt. Anschließend wurde 30 min in Alcianblaulösung bei pH 2,5 (1 % Alcianblau in 3 % Essigsäure) gefärbt und in destilliertem Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden entwässert und eingedeckt (s.o.).

- **Alcianblaufärbung bei pH 1,0**

Entparaffinierte Schnitte wurden in Wasser gebracht und 3 min in 0,1 N Salzsäure eingestellt. Anschließend wurden sie 30 min in Alcianblaulösung bei pH 1,0 (1 % Alcianblau in 0,1 N Salzsäure) gefärbt, kurz in 0,1 N Salzsäure gespült, entwässert und eingedeckt (s.o.).

### **Osmierung**

Die Behandlung von biologischen Proben mit Osmiumtetroxid führt zur Vernetzung von Lipiden und anderen Molekülen an ungesättigten Bindungen (Doppelbindungen). Dies bewirkt einerseits eine Fixierung dieser Substanzen, andererseits aber auch eine Kontrastierung, da die betreffenden Strukturen innerhalb des Gewebes durch das gebundene Osmium schwarz erscheinen (PLATTNER und ZINGSHEIM 1987). Es lassen sich daher in begrenztem Maße Rückschlüsse auf die Zusammensetzung osmiophiler Probenbereiche ziehen.

Ein kleiner Teil der für die Paraffineinbettung vorgesehenen Probenstückchen wurde daher, wie die für REM und TEM fixierten Proben, mit 1 % Osmiumtetroxid (gelöst in Fixierungspuffer) nachfixiert und kontrastiert. Aus diesen Proben wurden Paraffinschnitte hergestellt und im Lichtmikroskop, gelegentlich auch im Rasterelektronenmikroskop, untersucht. Da die osmiophilen Probenbereiche sowohl im Lichtmikroskop, als auch im TEM und bedingt auch im REM lokalisierbar waren, konnten alle Proben gut miteinander verglichen werden. Dies ermöglichte eine bessere Orientierung in den Geweben anhand der osmiophilen Probenstrukturen und eine sichere Identifizierung lichtmikroskopisch erkannter Elemente (z.B. Zelltypen, Cuticula, Pigmentkörner) im TEM und REM.

### **Weitere Färbungen**

Zur besseren Sichtbarmachung von Tunikastrukturen wurden gelegentlich andere Farbstoffe verwendet, die jedoch keine weiteren Informationen über die histochemische Zusammensetzung der Tunika lieferten (Schnell- bzw. Kontrastfärbung). Geeignete Farbstoffe hierfür waren Toluidinblau (Fa. Serva, Fa. Merck) oder Orcein (Fa. Merck). Die Färbelösungen wurden nach BÖCK (1989) hergestellt.

### **Mikroskopie der Schnittpräparate**

Die Untersuchung der Schnitte erfolgte im Zeiss Axiophot Lichtmikroskop im Hellfeld, Differentiellen Interferenzkontrast (DIC) und Phasenkontrast (Geräteparameter siehe Abschnitt 2.6.1). Für die Untersuchung von schwächeren Fluoreszenzerscheinungen wurde außerdem ein Zeiss Axioplan Mikroskop mit 100 W Quecksilberdampfampe und Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung eingesetzt [Anregungswellenlängen: 365 nm (UV); 485 (blaugrün); 546 nm (grün)].

Einige Proben (20–40 µm dicke Paraffinschnitte, Acridinorange- oder Hämatoxylin-Eosin-Färbung) konnten auch im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (KLSM) fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Durch Abrastern einzelner, bis zu 1 µm dünner Probenebenen mit einem Laserstrahl (= „optischer Schnitt“) und Detektion der resultierenden Fluoreszenz aus genau dieser Probenebene kann hierbei eine verhältnismäßig hohe Auflösung, sowohl in xy- als auch in z-Richtung erreicht werden. Mittels geeigneter Software können Bildinformationen vieler „optischer Schnitte“ zu dreidimensionalen Gesamtbildern kombiniert werden. Die verwendeten Geräte waren LSM 510 (Fa. Zeiss) und TCS SP 2 (Fa. Leica).

## **2.7 Rasterelektronenmikroskopie**

Die Rasterelektronenmikroskopie ermöglicht die Darstellung dreidimensionaler Strukturen im Mikro- und Nanometerbereich. Andere mikroskopische Techniken (Lichtmikroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie) können zwar ebenfalls dreidimensionale Strukturen aufzeigen, dies jedoch nur mit relativ geringer Auflösung (Lichtmikroskopie) oder erheblichem technischen Aufwand bzw. aus kleinen, begrenzten Probenbereichen (z.B. durch Untersuchung von Serien-Ultradünnschnitten für TEM; Voraussetzung: Kontrastierbarkeit der Proben mit Schwermetallen).

### **2.7.1 Konventionelle Rasterelektronenmikroskopie**

#### **Fixierung, Entwässerung und Trocknung**

Für die konventionelle Rasterelektronenmikroskopie wurden Probenstückchen von wenigen Millimetern Kantenlänge aus den Kolonien von *C. dellechiaiei* herausgeschnitten (entfettete Rasierklingen!) und in 2,5 % Glutaraldehyd im Fixierungspuffer (140 mM Cacodylat, pH 7,0; Zusätze s. Abschnitt 2.5) fixiert. Bereits von Prof. R. WIRTH (Universität Regensburg) vorfixierte Bakterienisolate (in künstlichem Meerwasser mit 2,5 % Glutaraldehyd) wurden auf gereinigte Objektträger aufgetropft, mit einem Deckgläschen abgedeckt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Deckgläschen mit Hilfe einer Rasierklinge abgesprengt. Die Bakterienzellen haften nach dieser Behandlung gut auf dem Objektträger und können so weiter durch die Fixierungs- und Entwässerungsreihe geführt werden.

Anschließend wurden die Proben 3x im Puffer gewaschen und mit 1 % Osmiumtetroxid (im Fixierungspuffer) nachfixiert. Es folgten 3 Waschschrte in destilliertem Wasser, danach

wurden die Proben in aufsteigender Acetonreihe entwässert. In 100 % p.a. Aceton wurden die Probenstücke in eine Kritisch–Punkt–Trocknungsanlage (Polaron E 3100, Fa. GaLa Instruments) überführt und dort getrocknet.

### **Montieren, Besputtern und Mikroskopie der Proben**

Sehr kleine und flache Probenstückchen (z.B. Kalkschuppen) wurden mit Hilfe doppelseitig klebender, kohlehaltiger Folien (Leit–Tabs, Fa. Plano) auf Aluminium–Objektträgern (sog. „*stubs*“, Fa. Plano) befestigt. Überschüssiges, schlecht haftendes Material wurde mit Hilfe von Druckgasspray (Dust–off®, Fa. Falcon) vorsichtig abgeblasen.

Größere Probenstückchen wurden mit Hilfe eines auf 110 °C erwärmten, thermoplastischen Kunstharzes (Tempfix, Fa. Plano) unter stereomikroskopischer Kontrolle auf die *stubs* geklebt.

Glasobjektträger mit Bakterienproben wurden mit einem Glasschneider etwas zurechtgeschnitten und mit doppelseitigem Klebeband auf *stubs* befestigt. Da der Glasobjektträger ein Isolator ist, wurde eine leitende Verbindung zwischen Aluminiumteller und Glasoberfläche hergestellt, um im Rasterelektronenmikroskop Aufladungen der Proben zu vermeiden. Als Leitsubstanz wurde sogenannter Leitkohlenstoff (Leit–C, Paste von in Butylacetat suspendierten Kohlenstoffpartikeln; Fa. Neubauer) verwendet.

Nach dem Abkühlen wurden die Proben in einem Magnetron Sputter Coater (SCD 050, Fa. Baltec) mit Platin besputtert und anschließend im Feldemissions–Rasterelektronenmikroskop (S–4100, Fa. Hitachi) untersucht. Routinemäßig wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 8 kV mikroskopiert, gelegentlich variierte Beschleunigungsspannungen lagen zwischen 5 kV und 15 kV.

### **2.7.2 Rasterelektronenmikroskopie von Gefrierbrüchen (Technik nach TANAKA)**

Mit Hilfe der Kryobruichtechnik nach TANAKA (TANAKA und MITSUSHIMA 1984, Technik wird in der Arbeitsgruppe modifiziert angewendet) können innere Zellstrukturen durch Aufbrechen der Probe freigelegt werden. Im Gegensatz zu Schnittflächen folgen die Bruchflächen Zellstrukturen in der Probe, es kommt kaum zur Delokalisation und Quetschung von Zellbestandteilen. Da bei der Technik nach TANAKA die Proben vor dem eigentlichen Brechen chemisch fixiert werden, ist der Strukturerhalt viel besser als bei unfixiert aufgebrochenen Proben.

Bereits in Glutaraldehyd (2,5 % im Fixierungspuffer) und Osmiumtetroxid (1 %) vorfixierte Probenstückchen (vorzugsweise flache Keile) wurden in 30 % Dimethylformamid (DMF) gebracht, um Schäden durch Eiskristallbildung im Gewebe zu minimieren. Anschließend wurden die Stückchen vorsichtig mit einer in flüssigem Stickstoff gekühlten Pinzette aufgenommen und in flüssigem Stickstoff rasch eingefroren. Die gefrorenen Stückchen wurden auf einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Kupferblock gelegt und mit einer



ebenfalls gekühlten Apollo-Klinge (stabile Rasierklinge mit Griffschutz) gebrochen. Die erzeugten, gefrorenen Bruchstücke wurden in 30 % DMF überführt, entwässert und in der Kritisch-Punkt-Anlage getrocknet. Schließlich wurden die Kryobrach-Proben mit der Bruchfläche nach oben (Kontrolle im Stereomikroskop!) auf „stubs“ aufmontiert und besputtert (s. Abschnitt 2.7.1)

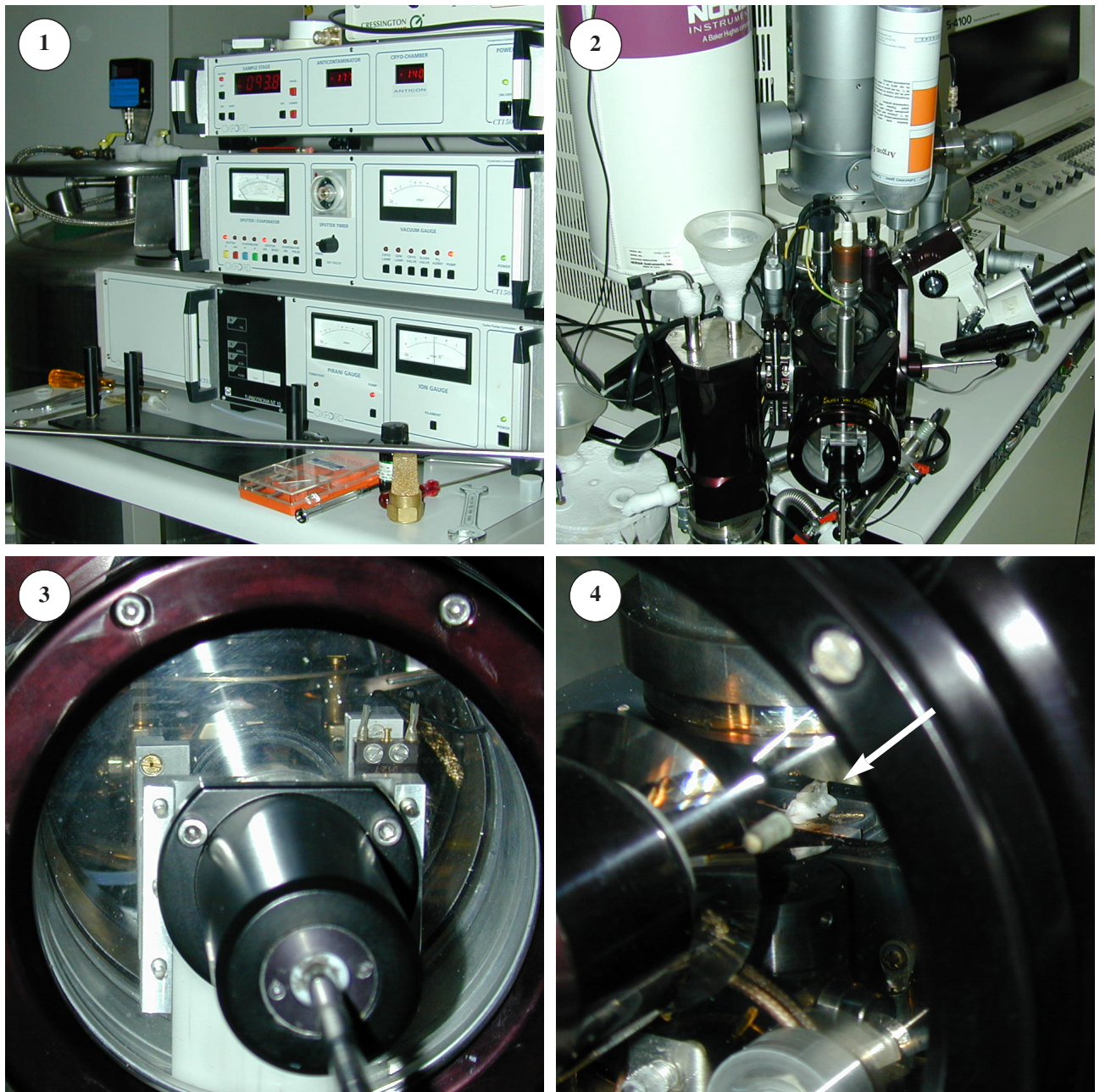
### 2.7.3 Kryo-Rasterelektronenmikroskopie

Die Kryo-Rasterelektronenmikroskopie (Kryo-REM, engl. „frozen hydrated“ SEM) ermöglicht die Untersuchung von Bruchflächen gefrorener Proben im voll hydratisierten Zustand bei Temperaturen von  $-100$  bis  $-194$  °C. Mit dieser Methode können empfindliche biologische Gewebe ohne vorausgegangene chemische Fixierung und Trocknung rasterelektronenmikroskopisch untersucht werden. Für diese Methode muß das Rasterelektronenmikroskop mit einer gekühlten, evakuierbaren Vorkammer zur Probenpräparation und einer kühlbaren Untersuchungskammer ausgestattet sein. Für die vorliegende Arbeit wurde das Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop S-4100 (Fa. Hitachi) mit dem Kryo-Transfersystem CT 1500 (Fa. Oxford) eingesetzt (s. Tafel 9).

Zunächst wurde ein kleines, etwa quader- oder keilförmiges Stückchen aus dem zu untersuchenden Koloniebereich herausgeschnitten (Länge der Probe ca. 3 mm). Dieses Stückchen wurde in einem großen Tropfen Gefrierschutzlösung (Tissue freezing medium, Fa. Reichert-Jung) mittels einer Feststellschraube in den Kryo-Probenhalter eingeklemmt, so daß etwa 2/3 der Probe aus dem Schlitz des Probenhalters herausragten. Anschließend wurde der Probenhalter mit der Probe in Stickstoffmatsch gehalten und so eingefroren. Die Verwendung von Stickstoffmatsch als Einfriermedium ermöglicht ein schnelleres Abkühlen der Probe, da Stickstoffmatsch im Gegensatz zu flüssigem Stickstoff kein Leidenfrost'sches Phänomen zeigt und so ein optimaler Kontakt zwischen Kühlmedium und Probe aufrechterhalten wird. Der Einfriervorgang wird beschleunigt, dadurch werden Strukturschäden in der Proben durch Eiskristallbildung verringert.

Die Proben wurden rasch in die mit flüssigem Stickstoff auf ca.  $-180$  °C gekühlte Kryo-Präparationskammer des Rasterelektronenmikroskops eingebracht und dort befestigt. Anschließend wurde die Kryokammer evakuiert und die Probe mit Hilfe einer parallel zur Probenoberfläche geführten Edelstahlklinge gebrochen. Von der freiliegenden Bruchfläche wurde ein Teil des Eises absublimiert, um einen besseren Einblick in die Zellen zu erhalten (= Gefrierätzung, Sublimationsdauer ca. 10 s bei  $90-95$  °C). Schließlich wurde die Probe in der Kryokammer mit Gold-Palladium besputtert, um die Oberfläche leitfähig zu machen und die Sekundärelektronenausbeute zu verbessern (Sputterschichtdicke ca. 2–5 nm).

Die Probe wurde auf den Probenstisch des Rasterelektronenmikroskops transferiert und dort unter ständiger Kühlung in gefrorenem Zustand mikroskopiert (Beschleunigungsspannung 8 kV).



**Tafel 9**

Kryo-Rasterelektronenmikroskopie

1. Steuerungseinheit für das Kryo-Präparationssystem.
2. Übersicht über die Kryo-Transfereinrichtung am Rasterelektronenmikroskop.
3. An das Mikroskop anflanshbare Kryokammer, in der die Probe gebrochen, geätzt und besputtert wird.
4. Probe in der Kryo-Kammer nach dem Gefrierbruch (Pfeil).

## 2.8 Transmissionselektronenmikroskopie

### Fixierung, Kontrastierung und Entwässerung der Proben

Für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung wurden Gewebestücke von etwa 1–2 mm Kantenlänge aus verschiedenen Tunikabereichen herausgeschnitten. Größere Proben werden wegen des ungünstigeren Oberflächen–Volumenverhältnisses nicht mehr ausreichend durchfixiert, besonders im Inneren des Probenstückchens kommt es dann zu Strukturveränderungen, die das transmissionselektronenmikroskopische Bild verfälschen können.

Das Zerteilen der Proben erfolgte mit einer frischen, entfetteten Rasierklinge in einer mit Fixativ (2,5 % Glutaraldehyd im Fixierungspuffer, s. Abschnitt 2.5) gefüllten Petrischale. Bakterienproben wurden abzentrifugiert (3000 upm, ca. 10 min, Tischzentrifuge Universal 30RF, Fa. Hettich), der Überstand abgenommen und Fixativ zugeführt.

Nach ein– bis zweistündiger Fixierung mit Glutaraldehyd wurden die Proben 3x mit Fixierungspuffer gewaschen und 2–4 h in 1 % Osmiumtetroxid nachfixiert und kontrastiert. Anschließend wurde wieder 3x gewaschen, diesmal in destilliertem Wasser.

Es folgte die Entwässerungsreihe aus 10 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 3x 100 % Aceton p.a., wobei dem 20 %–Aceton–Schritt noch 1 % Uranylacetat (Fa. Merck) zur Kontrastierung von Proteinen und Nucleinsäuren zugegeben wurde.

Von allen Tunikabereichen wurden zum Vergleich auch Proben ohne Osmium– und Uranylacetatbehandlung fixiert und eingebettet, um Aussagen über die Reaktivität bestimmter Probenstrukturen mit den Kontrastierungsmitteln treffen zu können.

Nach der Entwässerung wurden die Proben schrittweise in niederviskoses Epoxid–Kunstharz (SPURR–Harz, Härtestufe medium, Fa. Roth) gebracht (Harz–Aceton 1:2, Harz–Aceton 2:1, 100 % Harz). Die letzte Stufe (100 % Harz) wurde noch einmal wiederholt, um eventuelle Acetonrückstände zu entfernen.

### Einbettung

Nach mehrstündiger Infiltrationszeit in den Harzstufen wurden die Proben eingebettet. Hierzu wurden Probenstückchen mit einer weitlumigen Kunststoffpipette in kegelförmige Plastikkapseln (BEEM–Kapseln, Fa. Plano) übertragen (= nicht–orientierte Einbettung) bzw. zur gezielten Untersuchung bestimmter Probenschichten in flache, abgestumpfttrautenförmige Silikonformen (Fa. Plano) ausgerichtet eingelegt (= orientierte Einbettung). Die orientierte Einbettung erleichterte das gezielte Auswählen bestimmter Tunikabereiche (z.B. Oberfläche, Zooidnähe) für die Herstellung der Ultradünnschnitte. Das Restvolumen der Einbettformen wurde mit frischem Kunstharz aufgefüllt und die Proben anschließend im Wärmeschrank bei 65 °C über Nacht ausgehärtet (Polymerisation).

**Trimmen und Schneiden der Proben**

Mit einem „Pyramitom“ (Modell 11800, Fa. LKB) wurden zunächst Semidünnschnitte (Schnittdicke 1–2  $\mu\text{m}$ ) hergestellt, um den zu schneidenden Probenbereich im Lichtmikroskop auswählen zu können. Das Trimmen der Proben auf eine Anschnittfläche von 0,5–1 mm Kantenlänge erfolgte dann mit Hilfe des Pyramitoms bzw. einer Trimmfräse (TM 60, Fa. Reichert–Jung).

Die für die Semidünnschnitte benötigten Glasmesser wurden mit Hilfe eines sog. „Knifemakers“ (Modell 7800, Fa. LKB) aus Glasstreifen (Fa. Labtec) gebrochen. Für die Ultramikrotomie wurden besonders glatt gebrochene Glasmesser ausgewählt und mit Plastiktrögen (Fa. LKB) versehen. Besonders dünne Ultradünnschnitte (Schnittdicke 40–50 nm) und Ultradünnschnitte in verkalkten Tunikabereichen wurden mit Diamantmessern (Fa. Diatome) hergestellt.

Die Ultradünnschnitte wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut E, Fa. Reichert–Jung bzw. LKB) geschnitten und aus den mit Ampuwa® (pyrogenfreies destilliertes Wasser, Fa. Fresenius) gefüllten Messertrögen auf Kupfernetzchen („Grids“, Maschenzahl G75–G300, Fa. Science Services) „aufgefischt“.

**Nachkontrastierung und Mikroskopie**

Nach dem Trocknen wurden die Schnitte 1 min mit alkalischer Bleicitratlösung (pH 12, Lösung nach REYNOLDS 1963) behandelt, um den elektronenmikroskopischen Kontrast von Membranen, Proteinen, Nucleinsäuren und Glykogen nochmals zu verbessern. Zur Untersuchung der Reaktivität von Probenstrukturen mit Kontrastierungsmitteln wurden gelegentlich auch Schnitte ohne Bleicitrat–Nachbehandlung mikroskopiert.

Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Ultradünnschnitte erfolgte im EM 109 (Fa. LEO) mit Energiefilterung im „zero loss mode“ bei 80 kV bzw. im EM 912 (Fa. Zeiss, Beschleunigungsspannung 80 kV).

**Abschätzung von Bakteriendichten aus TEM-Aufnahmen**

Aus TEM-Aufnahmen konnten nach Messung der Bakterien-Schnittflächen Volumenanteile von Bakterien berechnet werden (Prinzip von DELESSE: Summe der Partikelflächen im Schnitt entspricht der Summe der Volumenanteile pro Volumeneinheit des Gewebes; WEIBEL 1973). Da die Größe der Bakterienzellen durch parallel durchgeführte REM–Untersuchungen bekannt war, konnte aus dem Volumenanteil die Anzahl der Bakterien abgeschätzt werden.

## 2.9 Analytische Verfahren

Zur Klärung der chemischen Zusammensetzung von Tunikabestandteilen (Fasermatrix, Zellinhalte, Kalkschuppen) und ihrer Reaktivität mit Kontrastierungsmitteln (Osmiumtetroxid, Uranylacetat) wurden, zum Teil in Kooperation mit Prof. Dr. J. FROMM (Institut für Holzforschung, TU München) verschiedene analytische Techniken eingesetzt.

### 2.9.1 Analyse der Tunikaflüssigkeit

#### Sulfat– und Chloridtest

Zur Analyse der in der Tunikaflüssigkeit vorkommenden Ionen als mögliche Bestandteile der Tunikasäuren wurde ein einfacher Sulfat– bzw. Chloridtest durchgeführt. Für den Sulfatetest wurde zu einem Tropfen Tunikaflüssigkeit in einer schwarzen Tüpfelplatte ein Tropfen wäßrige Bariumchlorid–Lösung (1 %) gegeben. Anhand des ausfallenden, schwerlöslichen Bariumsulfats (gut sichtbar im Stereomikroskop) kann bestimmt werden, ob die getestete Lösung Sulfationen enthält. Analog wurde im Chloridtest ein Tropfen Tunikaflüssigkeit in einer schwarzen Tüpfelplatte mit einem Tropfen 1 % wäßriger Silbernitrat–Lösung versetzt. Ausfallendes, schwerlösliches Silberchlorid zeigt an, ob in der unbekannten Lösung Chloridionen vorhanden sind.

#### Osmolalität

Die Osmolalität der Tunikaflüssigkeit und des Fixierungspuffers wurde mit Hilfe eines Osmometers (Osmomat 030, Fa. Gonotec) über Gefrierpunktniedrigung gemessen. Das Probenvolumen betrug 50 µl.

#### pH–Wert–Messung

Die Messung des pH–Wertes nativer Gewebeflüssigkeiten konnte wegen der geringen absaugbaren Mengen an Tunika– bzw. Zooidsaft (max. Probenmenge 100–200 µl) nicht an einem konventionellen pH–Meßgerät mit Glaselektrode durchgeführt werden, da die erforderliche Eintauchtiefe für die Elektrode mindestens 2–3 cm (Probenvolumen mindestens 1 ml) beträgt. Native Flüssigkeiten wurden daher auf vielstufiges pH–Papier (Fa. Merck) aufgetropft und die Verfärbung des Papiers im Tageslicht anhand der produktbezogenen Farbskala ausgewertet.

Der pH–Wert von Fixierungspuffer und Fixativ wurde mit einem pH–Meßgerät (pH–Meter 761 Calimatic, Fa. Bachofer) ermittelt.

### 2.9.2 Analyse der Tunikamatrix

Für die Untersuchung der Zusammensetzung der Tunikamatrix wurden zunächst Koloniescheiben von *C. dellechiaiei* gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage 15 K-B, Fa. Piatkowski). Zur Bestimmung des Gehaltes an Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H) und Stickstoff (N) wurden die Proben im CHN-Analysator verbrannt und anhand der entstehenden Gasmengen (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NO<sub>x</sub>) der organische Anteil der Proben in Gewichtsprozent abge-

schätzt. Zur genaueren Analyse eventueller am Aufbau der Kolonien beteiligter Kohlenhydrate wurden gefriergetrocknete Proben von *C. dellechiaiei* in 100% Trifluoressigsäure hydrolysiert. In einem automatischen Zuckeranalysator wurde der Glukoseanteil und der Anteil anderer Monosaccharide (z.B. Galaktose) im Hydrolysat bestimmt (Angabe in Gewichtsprozent).

### 2.9.3 Elementanalyse im Rasterelektronenmikroskop (EDX)

Bei der Elementanalyse im Rasterelektronenmikroskop wird die Eigenschaft von Probenbestandteilen genutzt, bei Anregung durch Elektronenstrahlung charakteristische Röntgenstrahlung auszusenden. Mit Hilfe eines speziellen Detektors wird die Röntgenstrahlung aufgenommen und in Abhängigkeit ihrer Energie aufgezeichnet (energiedispersive Röntgenspektrometrie, engl. *Energy Dispersive X-ray analysis* = EDX). Aus den ermittelten Werten wird mit Hilfe geeigneter Hard- und Software auf die qualitative Zusammensetzung der Probe geschlossen. Quantitative Aussagen sind möglich, es können aber relative Mengenverhältnisse der einzelnen Elemente untereinander abgeschätzt werden.

Als Probenträger hat sich eine thermostabile Polyesterfolie (Melinex<sup>®</sup>, Fa. DuPont, Vertrieb Fa. Plano) bewährt. Diese Folie besteht aus Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff und enthält keine weiteren Elemente, die bei der EDX-Analyse stören. Da die Folie selbst ein Isolator ist, muß zwischen der Folienoberfläche (später kohlebedampft) und dem Aluminiumobjektträger eine leitende Verbindung mit Leitkohlenstoff (Paste von in Butylacetat suspendierten Kohlenstoffpartikeln; Fa. Neubauer) geschaffen werden.

Für die EDX-Analyse von *Cystodytes dellechiaiei* wurden verschiedene Probentypen (s. Tabelle 4) präpariert und im Vakuum mit Kohle bedampft (Bedampfungsgerät BAE 121, Fa. Balzers).

**Tabelle 4**

*Präparation von Proben für die Elementanalyse (EDX)*

Probentyp	Präparation für die Elementanalyse
Tunikaflüssigkeit	Absaugen aus der Tunika, Auftropfen auf Melinexfolie, Bedampfen mit Kohle
Zooidpreßsaft	Absaugen aus gequetschten Zooiden, Auftropfen auf Melinexfolie, Bedampfen mit Kohle
Kryoproben von Tunika- und Zooidgewebe	Kryopräparation s. Abschnitt 2.7.3., beachte: Gold-Palladium-Besputterung
Semidünne Harzschnitte von Tunikagewebe	Schneiden (s. Abschnitt 2.8) Aufbringen auf gereinigte Glasobjektträger in Ampuwa <sup>®</sup> , bzw. auf Melinexfolie Strecken und Trocknen im Wärmeschrank (40 °C) Bedampfen mit Kohle

## 2.10 Fotografie und digitale Bildverarbeitung

Ein Großteil der für diese Arbeit verwendeten Fotos wurde digital aufgenommen.

Am Lichtmikroskop (Zeiss Axiophot) und am Stereomikroskop geschah dies mit Hilfe eines spezialangefertigten Fototubus und einer hochauflösenden Digitalkamera (Nikon N90 mit Kodak DCS 460 Digitalmodul; Auflösung 3600x2400 Pixel) mittels Kodak Software-Plug-in für Adobe® Photoshop®. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen am Zeiss Axioplan Mikroskop wurden größtenteils mit einer am Fotoausgang des Mikroskops montierten CCD-Kamera (Fa. Photometrics) erzeugt, koloriert und über die Kamerasoftware (IP-Lab Spectrum 10, Version 3.0, Fa. Signal Analytics) und ein Konvertierungsprogramm (Graphic Converter, Fa. Lemkesoft) in Adobe® Photoshop® importiert.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit dem externen Bildaufnahmesystem DigiScan (Fa. Gatan) am REM erzeugt, mit Hilfe spezieller Software (Digital Micrograph, Versionen 2.5 und 3.4.4, Fa. Gatan) bearbeitet und schließlich in Adobe® Photoshop® importiert. Die Bildbearbeitung beinhaltete im Wesentlichen eine Kontrastoptimierung sowie eine Optimierung der Farbwerte entsprechend den Farbwerten der Schnitte bei den LM-Aufnahmen.

Die Digitalisierung der Negative (Materialien s. Tabelle 5) erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Saphir Ultra2, Fa. Linotype-Hell).

Farbdiafilme (s. Tabelle 5), die für Aufnahmen mit konventionellen Kameras (eingebaute Kamera am Zeiss Axiophot bzw. Unterwasserkamera Motormarine 2 EX, Fa. Sea&Sea) verwendet wurden, wurden zur Entwicklung professionellen Fotolabors (Fa. Kempter und Fa. Sauter) übergeben. Anschließend wurden die Dias mit einem hochauflösenden Diascanner (LS 2000, Fa. Nikon) digitalisiert und in Adobe® Photoshop® importiert.

Schemazeichnungen wurden mit Hilfe des Adobe® Illustrator® erstellt.

**Tabelle 5**

*Fotomaterialien*

<b>Farbdiafilm</b>	Ektachrome 160T (Diafilm für LM; Fa. Kodak)
<b>S/W-Filme</b>	Agfapan APX 25 und APX 100 (Rollfilme für EM 109; Fa. Agfa) Electron image film SO-163 (Planfilm für EM 912; Fa. Kodak) Agfapan APX 100 (Rollfilm für REM, Fa. Agfa)
<b>Negativentwickler</b>	Rodinal B&W film developer (Fa. Agfa)
<b>Negativfixierer</b>	Acidofix fixer (Fa. Agfa)
<b>Netzmittel</b>	Mirasol Antistatic (Fa. Tetenal)
<b>Fotopapier</b>	Multicontrast Premium MCD 310 RC (Fa. Agfa)
<b>Positiventwickler</b>	Neutol NE B&W paper developer (Fa. Agfa)
<b>Positivfixierer</b>	Hypam rapid fixer (Fa. Ilford)



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Aufbau der Kolonien von *Cystodytes dellechiaiei*

##### Farbvarianten und Habitus

Frisch gesammelte Kolonien von *Cystodytes dellechiaiei* aus dem beprobten Gebiet haben entweder eine tiefviolette oder (selten) eine graugrüne Farbe (Tafel 10, 11). Die kleinsten am Standort gesammelten Kolonien hatten einen Durchmesser von 3 mm und eine Höhe von 3–4 mm (Tafel 10, Abb. 4). Kleinere Kolonien konnten im Artenmosaik am Felsen nicht mehr sicher erkannt werden. Sehr große Kolonien erreichen einen Durchmesser von 8 cm und eine Höhe von 10 mm. Die Kolonien zeigen also eine Tendenz zum flächigen Wachstum, die Höhenzunahme wachsender Kolonien ist relativ gering. Kleine und mittlere Kolonien sind etwa polsterförmig, während große Kolonien flächig ausgebreitet und gelappt erscheinen (Tafel 10). Die Oberfläche ist glatt und frei von makroskopisch sichtbarem Aufwuchs (Tafel 10, Abb. 4).

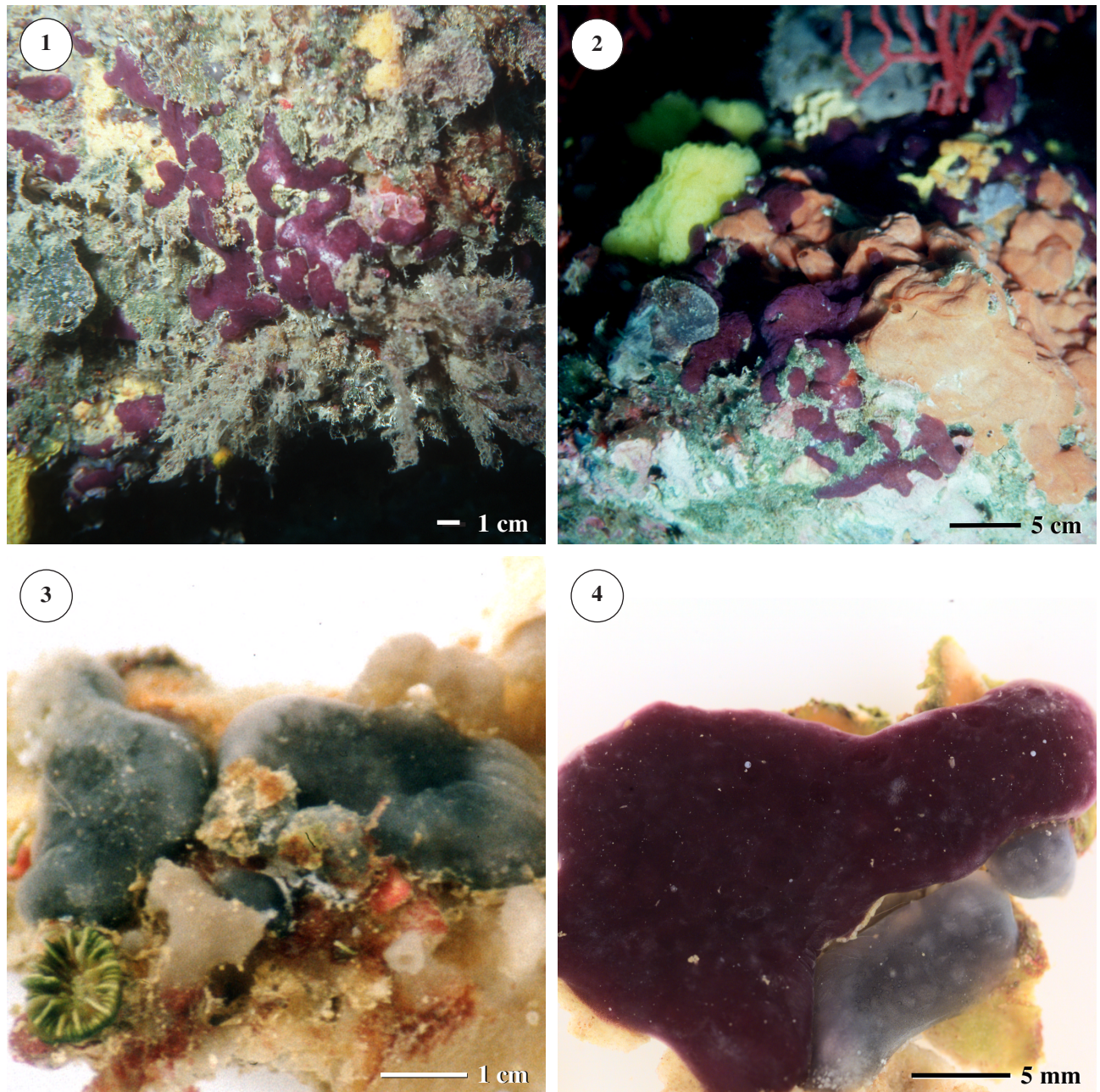
Mit Hilfe des Stereomikroskops, selten auch mit bloßem Auge, sind bei frisch gesammelten Kolonien zahlreiche kreisförmige Öffnungen an der Tunikaoberfläche erkennbar, durch die die Zooide (Einzeltiere) mit Atemwasser und Nahrung versorgt werden (Tafel 11, Abb. 1 und Abb. 2). Die Zooide selbst sind von außen nicht sichtbar, da sie etwa 1–2 mm unter der Kolonieoberfläche in die opake Tunika eingebettet sind.

Die Zooide sind in kreisförmigen oder elliptischen Systemen angeordnet, die aus je etwa 5–10 Zooiden gebildet werden. Offensichtlich gibt es keine kollektiven Tunikakanäle und –öffnungen, sondern jedes Zooid besitzt einen eigenen, meerwassergefüllten Kanal, über den der Wasseraustausch für Atmung, Ernährung und Exkretion erfolgt. Bei gehäuterten Tieren waren die Kanäle und deren Öffnungen an der Tunikaoberfläche innerhalb weniger Stunden bzw. Tage aufgrund von Regressionsvorgängen nicht mehr nachweisbar (auf diese Veränderungen wird in Abschnitt 3.2.2 ausführlicher eingegangen). Gelegentlich, vor allem nach einer andauernden Wärmeperiode im Juli 2000, konnten auch freilebende Kolonien am natürlichen Standort vorgefunden werden, deren Öffnungen verschlossen waren.

Die Zooide und Kalkschuppen der violetten Kolonien sind anatomisch nicht von den Zooiden und Kalkschuppen der graugrünen Kolonien zu unterscheiden, daher kann davon ausgegangen werden, daß es sich hier lediglich um zwei Farbvarianten derselben Art handelt.

Die Unterseite (substratzugewandte Seite) der Kolonien ist unregelmäßig geformt und der Oberflächenstruktur des jeweiligen Substrates angepasst (Tafel 11, Abb. 3). Kleine Substratteile (Sand, Steinchen, Kalkröhren von Polychaeten) oder von *C. dellechiaiei* überwachsene Organismen (Schwämme, Algen) haften für gewöhnlich sehr fest an der Unterseite und lassen sich nur schwer entfernen. Gelegentlich konnten auch von Polychaeten stammende Kalkröhren beobachtet werden, die völlig von Tunikagewebe umwachsen waren.



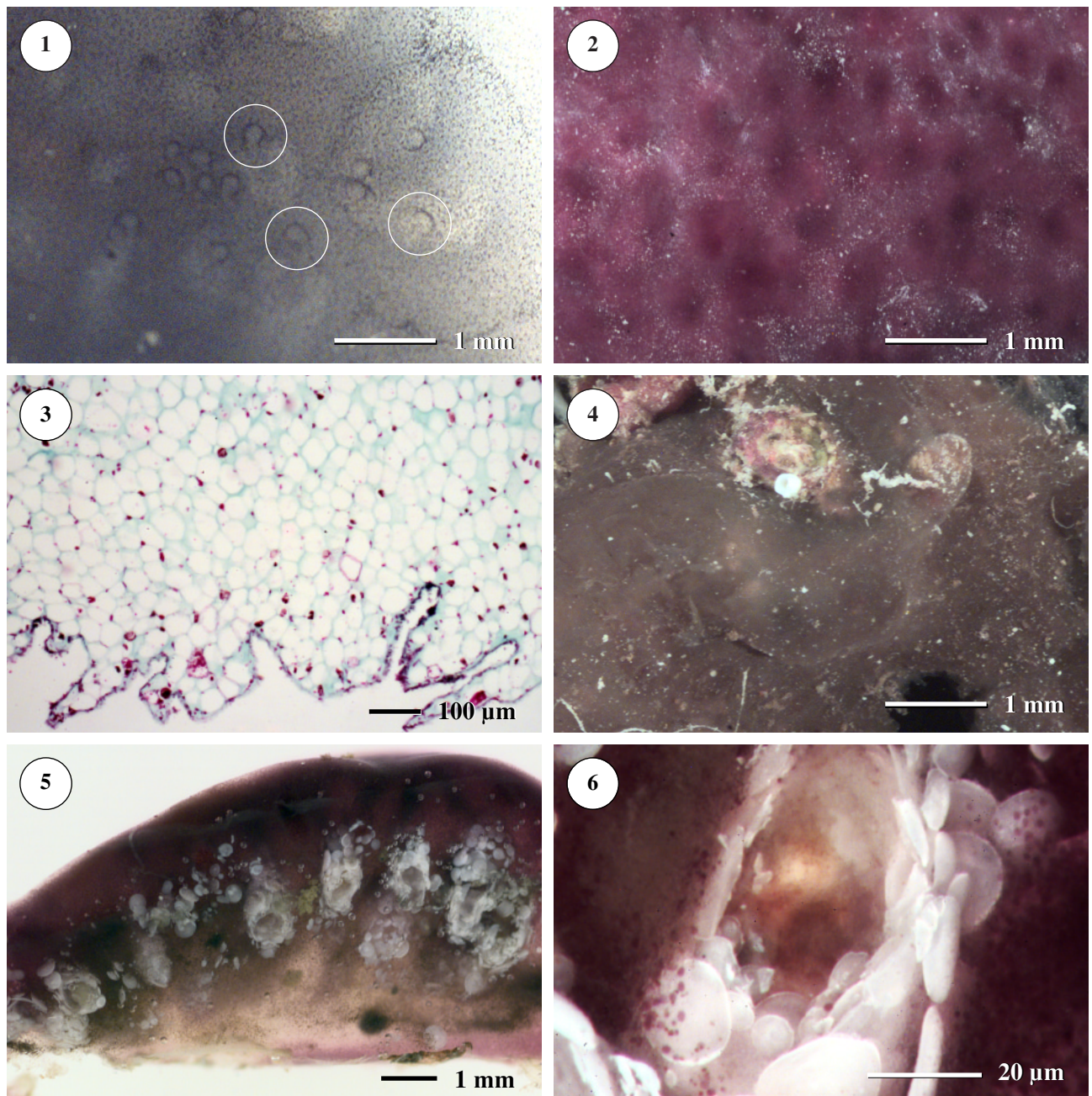


### Tafel 10

Habitus der Kolonien von *Cystodytes dellechiaiei*

1. Unterwasseraufnahme von violetten *Cystodytes dellechiaiei*-Kolonien in ca. 4 m Tiefe. In diese Tiefe konkurrieren vor allem Algen um Siedlungsplätze mit Ascidien und Schwämmen.
2. Unterwasseraufnahme von violetten *C. dellechiaiei*-Kolonien in ca. 25 m Tiefe. Algen sind in dieser Tiefe häufig von Schwämmen und Ascidien verdrängt, die ein artenreiches Mosaik auf Hartsubstraten bilden.
3. Habitusbild von zwei graugrünen Kolonien. Die Kolonien haften teilweise sehr fest am Substrat (hier: Kalkskelette von Kalkrotalgen) und lassen sich nur schwer entfernen.
4. Makroaufnahme einer mittelgroßen violetten und zweier kleiner graugrüner Kolonien, die auf demselben Substrat wachsen, aber deutlich voneinander abgegrenzt erscheinen. Die kleinen graugrünen Kolonien sind eher polsterförmig, während die größere violette Kolonie flach und gelappt ist.





### Tafel 11

#### Aufbau der Kolonien von *Cystodytes dellechiaiei*

1. Stereomikroskopische Aufnahme einer frisch gesammelten, grünen Kolonie von *C. dellechiaiei*. An der Oberfläche sind zahlreiche kreisförmige Öffnungen zu sehen (Kreise).
2. Stereomikroskopische Aufnahme der Oberfläche einer ca. 5 Tage gehälterten, violetten Kolonie. Die Öffnungen sind verschlossen.
3. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Längsschnitts durch eine violette Kolonie, Kolonieunterseite mit Falten als Anpassung an unregelmäßig geformtes Substrat. Färbung: Alcianblau bei pH 2,5 und Safranin.
4. Stereomikroskopische Aufnahme einer abgestorbenen Kolonie. Die Kolonie ist braun verfärbt.
5. Makroaufnahme einer aufgeschnittenen, violetten Kolonie. Die weißen Zooidkapseln liegen 1 - 2 mm unterhalb der Kolonieoberfläche. Bei dieser Kolonie sind die Zooide selbst bereits herausgelöst.
6. Stereomikroskopische Aufnahme einer Zooidkapsel aus Kalkschuppen. Das Zooid ist gelb.

Der Tod der Tiere geht mit einer auffälligen Farbveränderung einher: Abgestorbene oder fixierte Kolonien (bzw. Kolonieteile) beider Farbvarianten verfärbten sich von violett bzw. graugrün zu gelblich–braun (Tafel 11, Abb. 4). Durch Ansäuern mit 1n Salzsäure ließ sich die Farbänderung wieder rückgängig machen: Nach einigen Minuten werden die gelbbraunen Tunikaproben wieder rotviolett bzw. grün. Diese Farbänderung betrifft jedoch nur das Tunikagewebe (Pigmentzellen, s. Abschnitt 3.3), die Zooide sind im frischen wie im fixierten Zustand gelb.

### Konsistenz der Kolonien

Wurden intakte Kolonien einseitiger Druckbelastung (z.B. durch festes Greifen beim Sammeln) ausgesetzt, so verformten sie sich in gewissem Maße plastisch, ohne zu platzen. Im unberührten Zustand waren die Kolonien durch den Turgordruck der zahlreichen Tunikazellen (s. Abschnitt 3.3) und die stabilen Kalkkapseln (s. Abschnitt 3.2.4) relativ fest. Nach dem Anschneiden hingegen war das Tunikagewebe weich–elastisch, angeschnittene Tunikazellen verloren ihre Turgeszenz und die Kalkkapseln wurden zum Teil aufgelöst.

### Anzahl, Lage und Habitus der Zooide in der Kolonie

Nach dem Durchschneiden der Kolonien werden die gelben Zooide innerhalb der violetten oder graugrünen Tunika sichtbar (s. Tafel 11, Abb. 6). Die Zooide sind etwa 1–2 mm lang, genauere Größenangaben lassen sich wegen der starken Kontraktionsfähigkeit der Zooide und der mangelnden Wirkung von Betäubungsmitteln nicht machen.

Die Anzahl der Zooide pro Kolonie ist relativ hoch: eine mittelgroße Kolonie enthält 80–100 Zooide. Allerdings sind die Zooide von *C. dellechiaiei* sehr klein, so dass sie nur einen geringen Teil des Gesamtvolumens der Kolonie ausmachen.

Folgende Abschätzung zeigt das ungefähre Verhältnis zwischen dem Volumen der Kolonie und dem Gesamtvolumen der darin befindlichen Zooide:

**Tabelle 6**

*Kolonien- und Zooidvolumina*

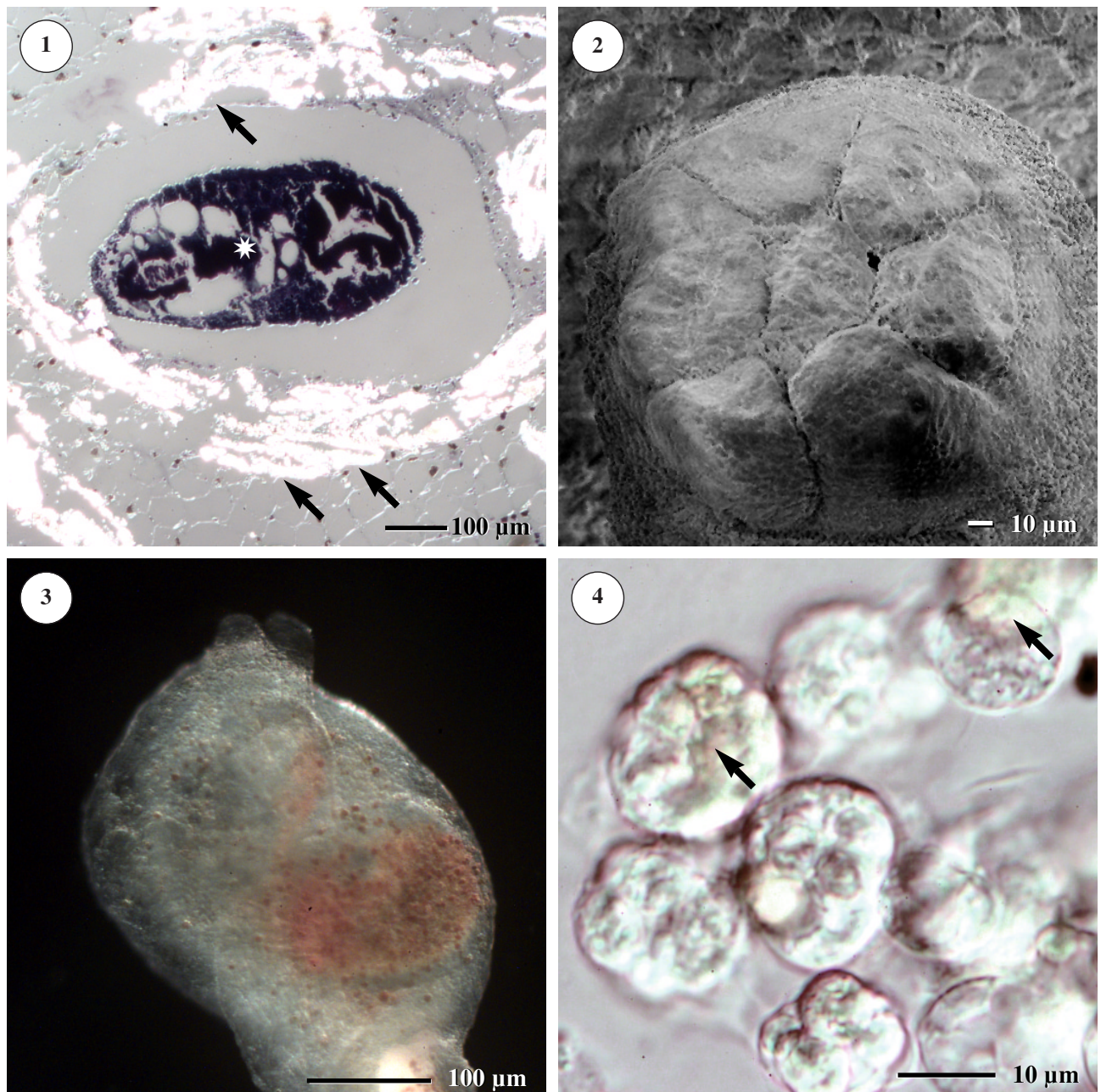
<b>Maße einer mittelgroßen Kolonie:</b>	20 mm x 30 mm x 5 mm
<b>Gesamtvolumen der Kolonie:</b>	3000 mm <sup>3</sup>
<b>Maße eines Zooids:</b>	1,5 mm x 0,5 mm x 0,5 mm
<b>Volumen eines Zooids:</b>	0,375 mm <sup>3</sup>
<b>Anzahl der Zooide pro Kolonie:</b>	100 Zooide pro Kolonie
<b>Gesamtvolumen der Zooide:</b>	100 x 0,375 mm <sup>3</sup> = 37,5 mm <sup>3</sup>
<b>Volumenanteile Zooidvolumen / Kolonievolumen:</b>	1,25 %

Daraus ergibt sich ein Volumenanteil von 1,25 % der Zooidgebewebe am Volumen der gesamten Kolonie. Der größte Anteil der Kolonie wird also nicht vom Zooidgebewebe, sondern von der Tunika gebildet.

Die Zooide liegen in den zentralen bis basalen (= substratzugewandten) Bereichen der Kolonie, etwa 1–2 mm unterhalb der Oberfläche (Tafel 11, Abb. 5). Bei frisch gesammelten Kolonien sind die Zooide mit der Meerwasserumgebung durch individuelle Kanäle verbunden. Verbindungen zwischen den einzelnen Zoiden einer Kolonie in Form von Kanälen oder Blutgefäßen konnten nicht beobachtet werden. Jedes Zoid liegt in einem eigenen kleinen Hohlraum, der von einer festen Kapsel aus überlappend angeordneten, scheibenförmigen Kalkschuppen umgeben ist (Tafel 12, Abb. 1). Die etwa eiförmige Zoidkapsel besitzt an der oberen Seite (anterior) eine Öffnung, durch die sich die Zooide in den Tunikakanal strecken können. Aus ihren Hohlräumen ließen sich die Zooide relativ leicht entfernen, häufig kam es dabei allerdings zu Abrissen des Abdomens, das nur über eine schmale Taille mit dem erheblich voluminöseren Thorax verbunden ist. Bei der Präparation von Tunikaproben brachen freigelegte Zooide häufig heraus und gingen verloren. Offensichtlich sind sie nur mit einem kleinen Teil ihres Abdomens fest mit der Tunika verbunden.

Die Zooide zeigten die von VAN NAME (1945) für *C. dellechiaiei* angegebenen morphologischen Eigenschaften: Sie besitzen je eine 6-lappige Branchial- und Atrialöffnung (Tafel 12, Abb. 2), ein gut sichtbares, häufig durch Kontraktion des Zooids gefaltet erscheinendes Endostyl und eine kompakte Form ohne Abdominalanhänge. Eine Atrialzunge ist nicht erkennbar. Das posterior der Gonaden liegende Herz ist schlauchförmig. Die gelbe Farbe der Zooide lässt sich auf orange pigmentierte Zellen in Epidermis und Blut zurückführen, die Carotinoide, aber keine Pyridoacridinalkaloide enthalten (STEFFAN, persönliche Mitteilung; Tafel 12, Abb. 3 und 4).





### Tafel 12

Zooide von *C. dellechiaiei*.

1. Lichtmikroskopische Aufnahme (DIC) eines Längsschnitts durch den Zooidbereich. Das Zooid (Stern) ist von einer Kapsel aus überlappenden Kalkschuppen (Pfeile) umgeben.
2. REM-Aufnahme der 6-lappigen Einströmöffnung eines Zooids. Die Öffnung ist als Folge der Zooidregression im Aquarium verschlossen.
3. Dunkelfeldaufnahme (LM) eines Zooids. Orange pigmentierte Zellen sind in Epidermis und Hämocoel des Zooids sichtbar.
4. Lichtmikroskopische Aufnahme (DIC) isolierter Blutzellen aus den Zooiden von *C. dellechiaiei*. Einige Blutzellen enthalten gelbes Pigment (Pfeile).

## 3.2 Struktur und Zusammensetzung der Tunika von *C. dellechiaiei*

Bereits im Lichtmikroskop (LM) lassen sich zwei Hauptkomponenten in der Tunika von *C. dellechiaiei* unterscheiden: Tunikazellen (Blasenzellen, Pigmentzellen, filopodiale Zellen, kompartimentierte Zellen und Morulazellen, s. Abschnitt 3.3) und eine extrazelluläre Matrix, in die diese Zellen eingebettet sind.

### 3.2.1 Tunikamatrix

Bisher gibt es keine Untersuchungen über die Struktur und Zusammensetzung dieser Matrix bei *C. dellechiaiei*. Daher wurden zunächst elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Struktur der Matrix durchgeführt. Außerdem wurde mit histochemischen Färbemethoden und analytischen Techniken versucht, die die Tunikamatrix bildenden Substanzen zu identifizieren.

An ungefärbten Schnitten im Lichtmikroskop erscheint die Tunikamatrix transparent und farblos (Tafel 13, Abb. 1). Sie füllt die häufig sehr schmalen Bereiche zwischen den einzelnen Tunikazellen vollständig aus (Tafel 13, Abb. 2). Die Kolonieoberfläche wird von einer dünnen, durchgehenden, zellfreien Matrixschicht gebildet, die auch die Tunikakanäle und Öffnungen umgibt.

### Ultrastruktur der Tunikamatrix

Im Rasterelektronenmikroskop (REM) wird die Feinstruktur der Tunikamatrix deutlich: Es handelt sich um ein dichtes Geflecht aus 15–25 nm dicken, drehrunden Fasern (Tafel 14). Im voll hydratisierten Zustand (Kryo-REM) haben die Fasern etwa den gleichen Durchmesser (Tafel 14, Abb. 1a und b), allerdings wird bei dieser Methode die Messung durch Eisbildung und Salzkristallisation in den Zwischenräumen benachbarter Fasern erschwert.

Die Matrixfasern liegen meist ungerichtet (Streutextur) und sind in allen Raumrichtungen verteilt (Tafel 14). Eine Ausbildung von Verzweigungen, Faserbündeln oder bandartigen Aggregaten wurde nicht beobachtet. An manchen Stellen in der Tunika, z.B. zwischen eng aneinander liegenden Tunikazellen oder Kalkschuppen, ist jedoch manchmal eine Vorzugsrichtung der Fasern zu erkennen: Hier verlaufen die Fasern streckenweise annähernd parallel.

Die Faseroberfläche ist nicht immer glatt: Sowohl im REM als auch im TEM sind häufig unregelmäßig angeordnete Verdickungen und Knötchen an den Fasern erkennbar. Im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) an Ultradünnschnitten zeigte sich, daß die Matrixfasern nur sehr schwach mit den verwendeten Kontrastierungsmitteln (Osmiumtetroxid, Uranylacetat, Bleicitrat) reagieren und dementsprechend schlecht darstellbar sind. Im Bereich der Tunikamatrix können im TEM daher nur sehr dünne Fasern von etwa 5–7 nm Dicke nachgewiesen werden (Tafel 13, Abb. 3 und 4). Dieser Faserdurchmesser ist erheblich geringer, als der Durchmesser der im REM nachgewiesenen

Matrixfasern. Zwischen den Matrixfasern können in Ultradünnschnitten auch kugelförmige, stark kontrastierte Einschlüsse nachgewiesen werden (Tafel 13, Abb. 4).

Als Abschluß der Kolonien zur Meerwasserumgebung hin wurden zwei verschiedene Schichten identifiziert: Nach außen wird die Tunika zunächst von einer sehr dünnen, zellfreien Cuticula (Dicke 70–100 nm) abgeschlossen, die um die gesamte Kolonie herum verläuft (Tafel 15, Abb. 3, 4, 6). Darunter folgt eine subcuticuläre Schicht aus besonders dicht angeordneten Matrixfasern (Tafel 15, Abb. 5).

Die Cuticula der Kolonien erscheint im TEM mäßig bis stark kontrastiert (Tafel 15, Abb. 3 und 4) und weist im Unterschied zu den larvalen Abschlußschichten (s. Abschnitt 3.5.2) keinerlei Papillen oder charakteristische Ornamente auf. Häufig sind große Falten auf der Cuticula erkennbar, sie verlaufen meist ohne bestimmte Vorzugsrichtung (Tafel 15, Abb. 1). Möglicherweise entstehen sie durch Anpassungen wachsender Kolonien an unregelmäßige Substrattopographien. Aufwuchsorganismen finden sich an der Oberfläche frisch gesammelter Kolonien kaum (Tafel 15, Abb. 3). Die Cuticula länger gehälterter Kolonien kann jedoch von vielen verschiedenen Bakterien- und Algentypen besiedelt sein (Tafel 15, Abb. 2, 4). Die Anzahl an aufwachsenden Mikroorganismen steigt mit zunehmender Hälterungsdauer.

Direkt unter der Cuticula folgt, als zweite Abschlußschicht, eine 20–30 µm dicke subcuticuläre Schicht aus sehr dicht angeordneten Matrixfasern (Tafel 15, Abb. 5). Hier sind die Abstände zwischen den einzelnen Fasern kleiner als 0,5 µm. Das Aussehen der Fasern in diesem Bereich unterscheidet sich jedoch nicht von den Matrixfasern im Inneren der Tunika: der Durchmesser der Fasern beträgt 15–25 nm, die Fasern sind drehrund und im TEM an Ultradünnschnitten nur zum Teil (Kernbereich ?) darstellbar. Im TEM erscheint die subcuticuläre Faserschicht deutlich schwächer kontrastiert als die Cuticula.

Unterhalb der beiden Abschlußschichten, etwa 30 µm unterhalb der Kolonieoberfläche, sind die Matrixfasern lockerer. Die Zwischenräume zwischen einzelnen Fasern haben im Inneren der Kolonien einen Durchmesser von etwa 1–2 µm. Vereinzelt treten sehr große Zwischenräume von 4–5 µm Durchmesser auf. Bei lebenden Kolonien sind diese Zwischenräume vermutlich größtenteils wassergefüllt, da in ihnen auch mit der Kryo-REM-Technik an chemisch unbehandelten Proben keine feste Grundsubstanz nachgewiesen werden konnte.

### **Zusammensetzung der Tunikamatrix**

Nachdem die TEM–Untersuchung der Fasermatrix an kontrastierten Ultradünnschnitten bereits Hinweise darauf gegeben hatte, daß die Fasern nur sehr geringe Mengen an Proteinen enthalten (schwache Kontrastierbarkeit mit Schwermetallen), wurden weitere Untersuchungen zur Matrix–Zusammensetzung durchgeführt. Bei der Analyse der Matrixsubstanzen wurden klassische, zumeist in der Humanmedizin etablierte histochemische Verfahren zur Untersuchung von Bindegeweben angewendet.

- **Färbung mit Chlorzinkjodlösung**

Nach Behandlung von Tunikaproben mit Chlorzinkjodlösung (= Cellulosenachweis) konnte keine Blaufärbung der Tunikamatrix beobachtet werden. Die Matrix blieb farblos–transparent.

- **PAS–Reaktion**

In der Perjodsäure–SCHIFF–Reaktion wurde die Matrix rosa angefärbt (Tafel 16, Abb. 1 und 2). Stärker reagierten die Abschlußschichten der Tunika (= subcuticuläre Schicht + Cuticula), die die Kolonie von der Meerwasserumgebung abgrenzen. Außerdem ließ sich eine stärkere Anfärbung der Matrix im Bereich der Zooidkapsel, also in der Umgebung der Kalkschuppen und der Zooidhöhlräume, und an den Tunikakanälen, beobachten. Dies läßt darauf schließen, daß auch in diesen Bereichen dichtere Schichten von Matrixfibrillen vorliegen. Der Versuch zeigte die Anwesenheit von Polysacchariden und / oder neutralen Mukopolysacchariden in der Tunikamatrix.

- **SCHIFF'sches Reagenz (Kontrolle zur PAS–Reaktion)**

SCHIFF'sches Reagenz ohne vorherige Oxidation des Materials durch Perjodsäure führte zu einer sehr schwachen rosa Anfärbung der Abschlußschichten und der Tunikamatrix im Bereich der Zooidkapsel, die Matrix im Inneren der Kolonie zwischen den einzelnen Zooidkapseln reagierte nicht mit SCHIFF'schem Reagenz. Freie Aldehyde kommen folglich in der Tunika von *C. dellechiaiei* nur in sehr geringen Mengen vor, das Ergebnis der PAS–Reaktion wird durch sie nicht wesentlich beeinflusst.

- **Färbungen mit Alcianblau**

Die Färbung mit Alcianblau bei pH 2,5 (zur Darstellung saurer Mukopolysaccharide; Tafel 16, Abb. 3 und 5) war mäßig positiv, die Matrix färbte sich mittel– bis hellblau. Ebenfalls positiv, wenn auch noch schwächer (sehr helles Blau), verhielt sich die Tunikamatrix gegenüber Alcianblau bei einem pH–Wert von 1,0 (Darstellung ausschließlich sulfatierter, saurer Mukopolysaccharide, Tafel 16, Abb. 4). Bei beiden pH–Werten ließ sich eine etwas stärkere Anfärbung der Abschlußschichten im Vergleich zur inneren Matrix beobachten.

- **Osmierung**

Osmiumtetroxid führte zu einer schwachen Graufärbung der Tunikamatrix im Bereich der Außenschicht und der Zooidkapseln (Tafel 16, Abb 6). Der übrige, weitaus größere Anteil der Tunikamatrix reagierte praktisch nicht mit Osmiumtetroxid. TEM–Untersuchungen zeigten, daß die Matrixfasern mit Schwermetallen nur sehr schwach kontrastierbar sind (Tafel 13, Abb. 3).



- **Vitalfärbungen, pH–Nachweis**

Weder die Vitalfärbung mit Acridinorange oder Fluoresceindiacetat, noch der säure-sensitive Farbstoff Lyso Sensor Blue DND–167 bewirkte eine von der Autofluoreszenz abweichende Fluoreszenz der (extrazellulären) Tunikamatrix.

- **Autofluoreszenz**

Die Fasermatrix fluoreszierte sehr schwach helltürkis bei Anregung durch UV–Licht (365 nm). Als Vergleich herangezogene Stückchen von Filterpapier oder Watte (reine Cellulose) fluoreszierten kräftig blau.

- **Enzymatischer Verdau der Tunikamatrix**

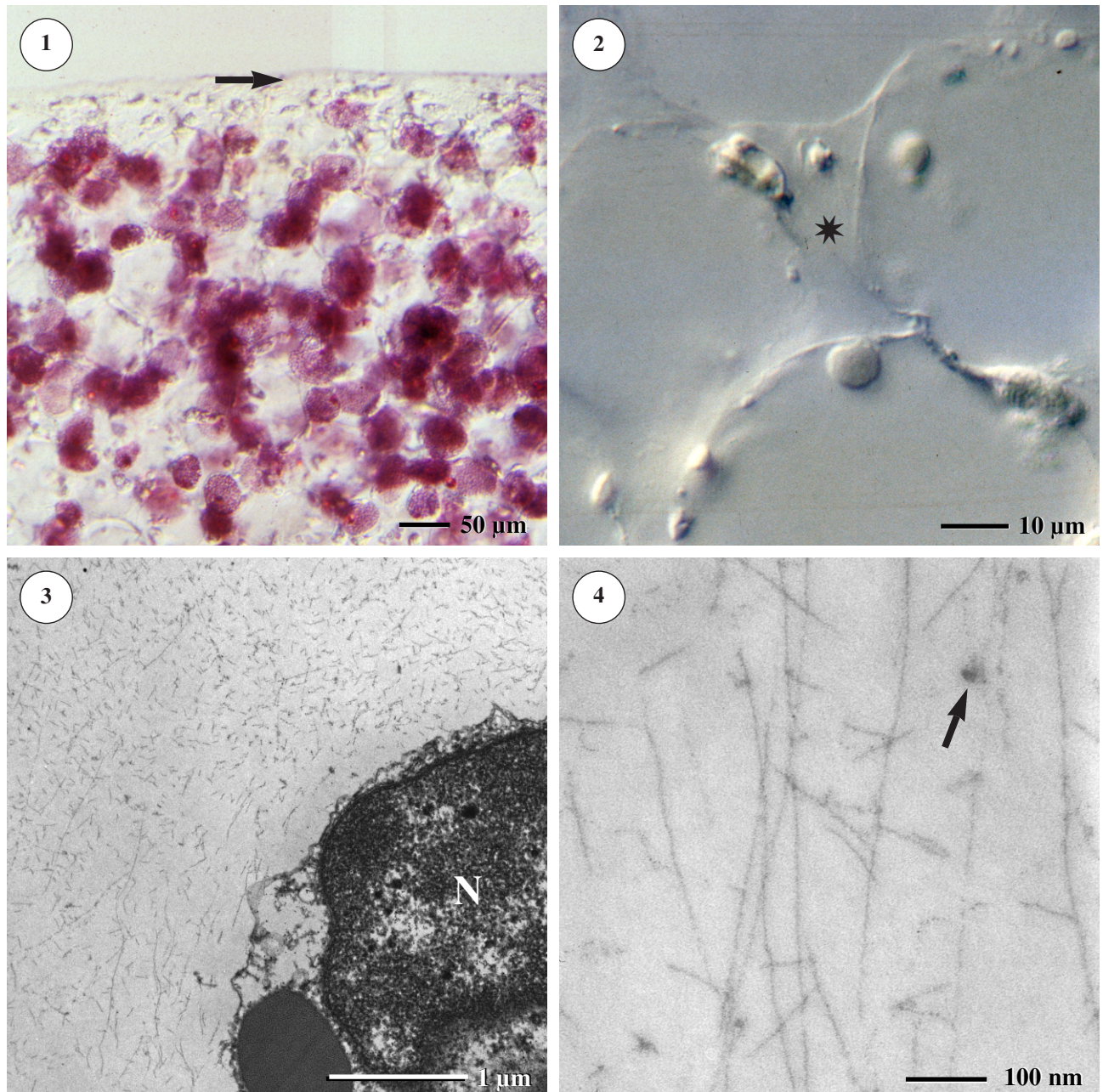
Der enzymatische Verdau unfixierten Tunikamaterials mit Proteinase K oder Cellulase führte zu einer leichten Erweichung der Tunikamatrix, die Zellgrenzen der Blasenellen waren nicht mehr klar erkennbar. Nach Behandlung mit Proteinase K war die Struktur der Tunikamatrix im LM körnig, Cellulase führte zu einem eher faserigen Aussehen der verbliebenen Matrixsubstanzen. Kontrollproben ohne Enzymbehandlung zeigten deutliche Zellgrenzen; die Fasermatrix war offensichtlich nicht angegriffen. Die Kombination von Cellulase und Proteinase K (fixiertes Material, s. Kapitel 2) bewirkte eine stärkere Aufweichung der Tunikamatrix; die Zellen verloren teilweise ihren Zusammenhalt und lösten sich aus dem Zellverband. Filopodiale Zellen bildeten gelegentlich ihre Ausläufer zurück und kugelten sich ab. Die übrigen Tunikazellen der enzymbehandelten Proben unterschieden sich in Farbe und Form aber nicht von entsprechenden Zellen der Kontrollproben ohne Enzymbehandlung. Matrix–Strukturen waren auch nach kombinierter Anwendung beider Enzyme noch deutlich erkennbar. Quantitative Analysen der verbliebenen Substanzen oder Färbeversuche konnten aufgrund der mechanischen Instabilität der Schnitte nicht durchgeführt werden.

- **Auflösung der Tunikamatrix mit wäßrigen Lösungsmitteln**

Mit bei der Präparation von Tunikaprobe anfallenden Restchen wurden Auflösungsversuche durchgeführt. Weder Kochen in konzentrierter Schwefelsäure oder konzentrierter Natronlauge, noch mehrtägige Inkubation in Xanthogenat– oder Calciumrhodanid–Lösung konnte die Tunikamatrix auflösen. Voruntersuchungen zur Chemie der Tunikamatrix (Hydrolyse und automatisierte Zuckeranalyse) in Kooperation mit Prof. J. FROMM (Institut für Holzforschung der TU München) zeigten, daß sich Tunikaprobe zu etwa 95 % mit Trifluoressigsäure hydrolysieren lassen. Die Lösungsprodukte enthalten nur etwa 1 % Glucose und 1,5 % Galactose und Mannose (Angaben in Gewichtsprozent der gefriergetrockneten Proben). Der maximale Gesamtgehalt an organischer Substanz in Kolonien von *C. dellechiaiei* beträgt 30 % (Schätzung nach CHN–Bestimmung, s. Abschnitt 2.9.2)

- **Elementanalyse der Tunikamatrix**

Energiedispersive Röntgenspektren (EDX–Spektren) der Tunikamatrix zeigen Kohlenstoff, Sauerstoff und Schwefel, gelegentlich treten Nebenpeaks (Cl, Si) auf (s. Tafel 17, Abb 1).

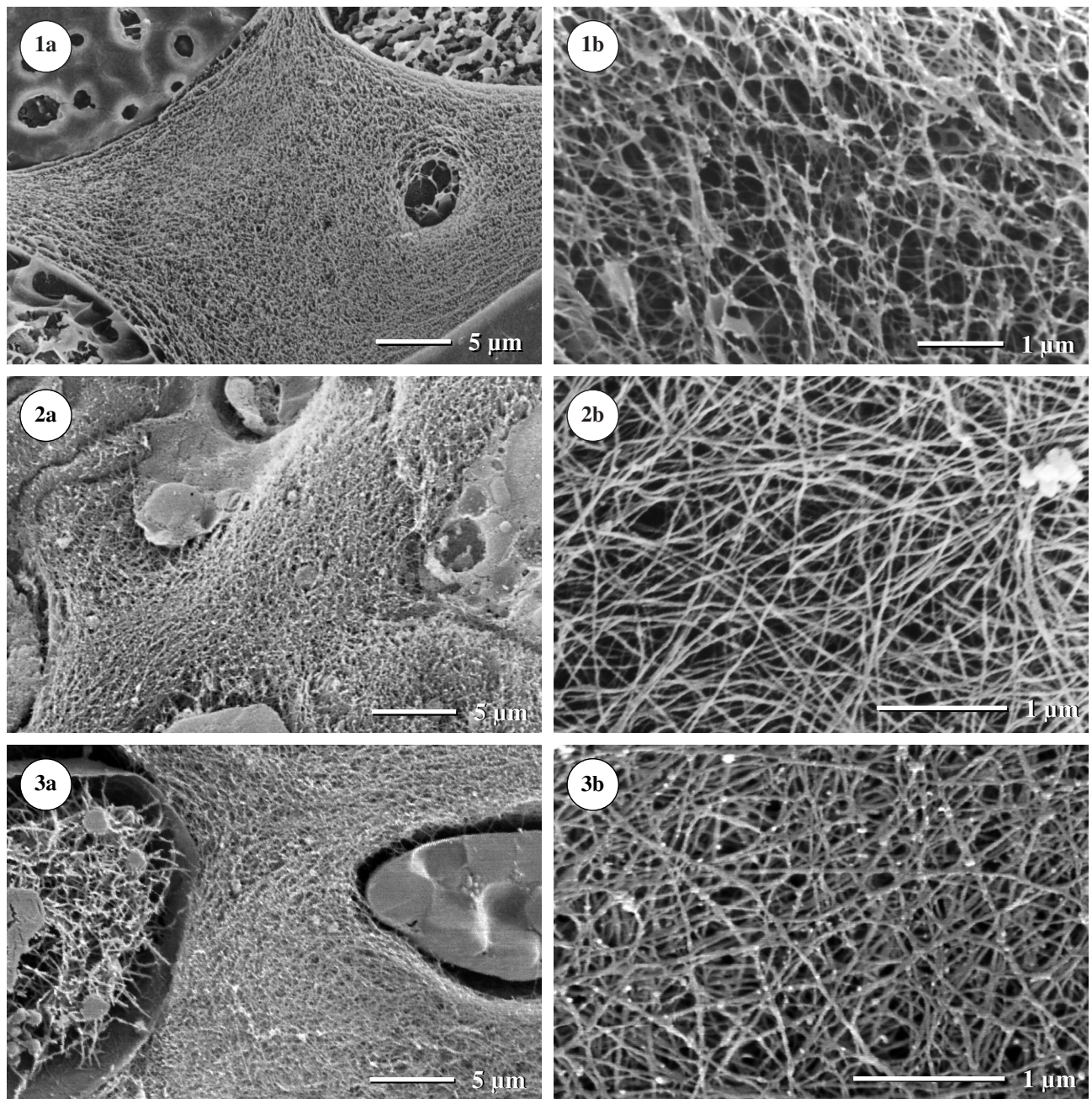


### Tafel 13

#### Tunikamatrix

1. LM-Aufnahme (DIC) eines Handschnittes durch den Randbereich einer frischen violetten Kolonie von *C. dellechiaiei*. Die Tunikazellen sind in eine transparente, farblose Matrix eingebettet. Die Koloniesoberfläche wird von einer dünnen, zellfreien Matrixschicht gebildet (Pfeil).
2. LM-Aufnahme (DIC) eines Handschnittes durch die Tunika. Die transparente Matrix (Stern) füllt die Bereiche zwischen den Tunikazellen vollständig aus.
3. Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme eines Ultradünnschnitts durch die Tunikamatrix von *C. dellechiaiei*. Die faserige Matrix erscheint im Vergleich mit Tunikazellen (z. B. Zellkern, N) schwach kontrastiert.
4. TEM- Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch die Tunikamatrix von *C. dellechiaiei*. Die im TEM darstellbaren Faserbereiche sind nur 5–7 nm dick. Zwischen den Fasern ist gelegentlich granuläres, stärker kontrastiertes Material erkennbar (Pfeil).

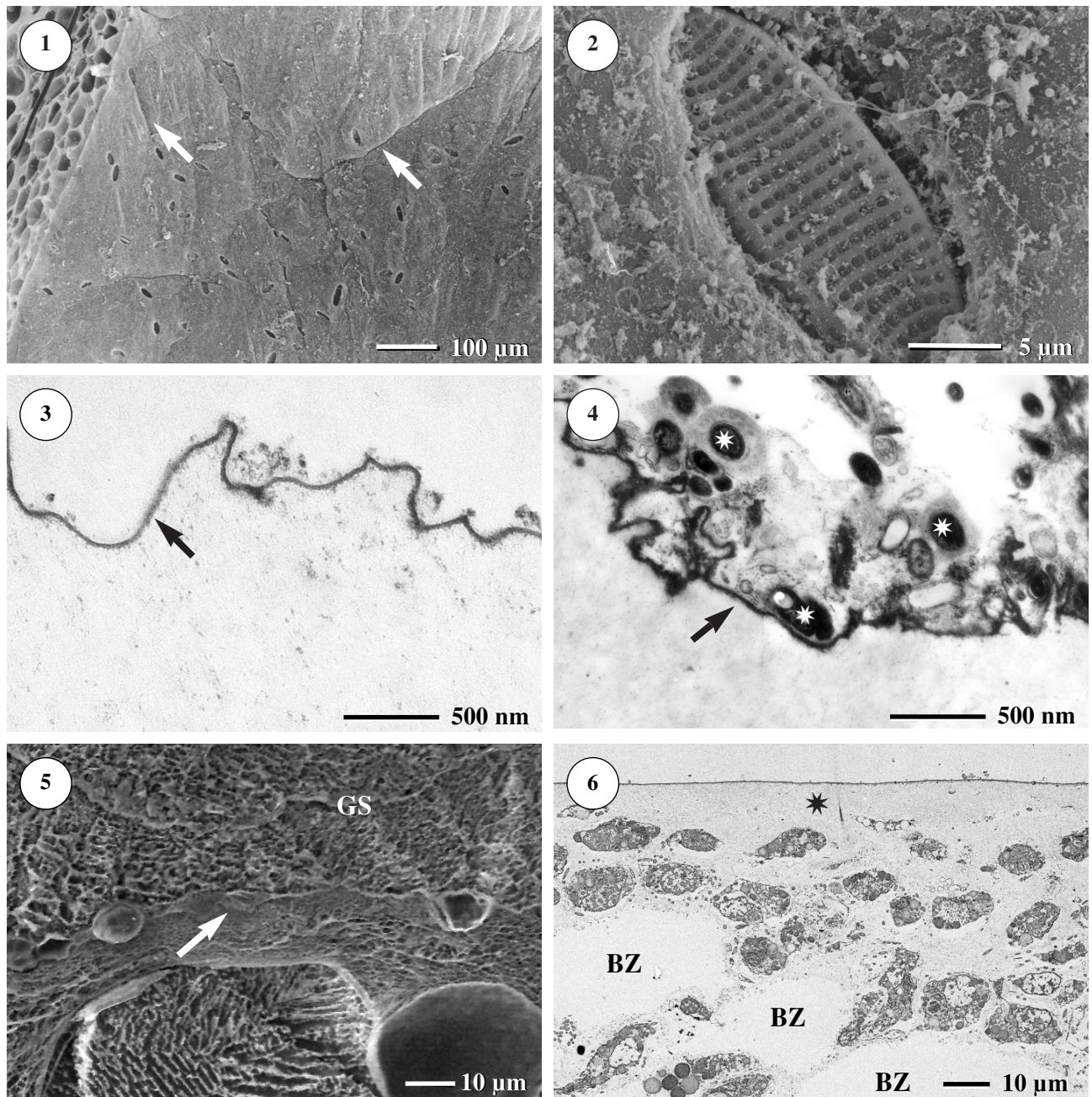


**Tafel 14**

Tunikamatrix von *C. dellechiaiei* (REM)

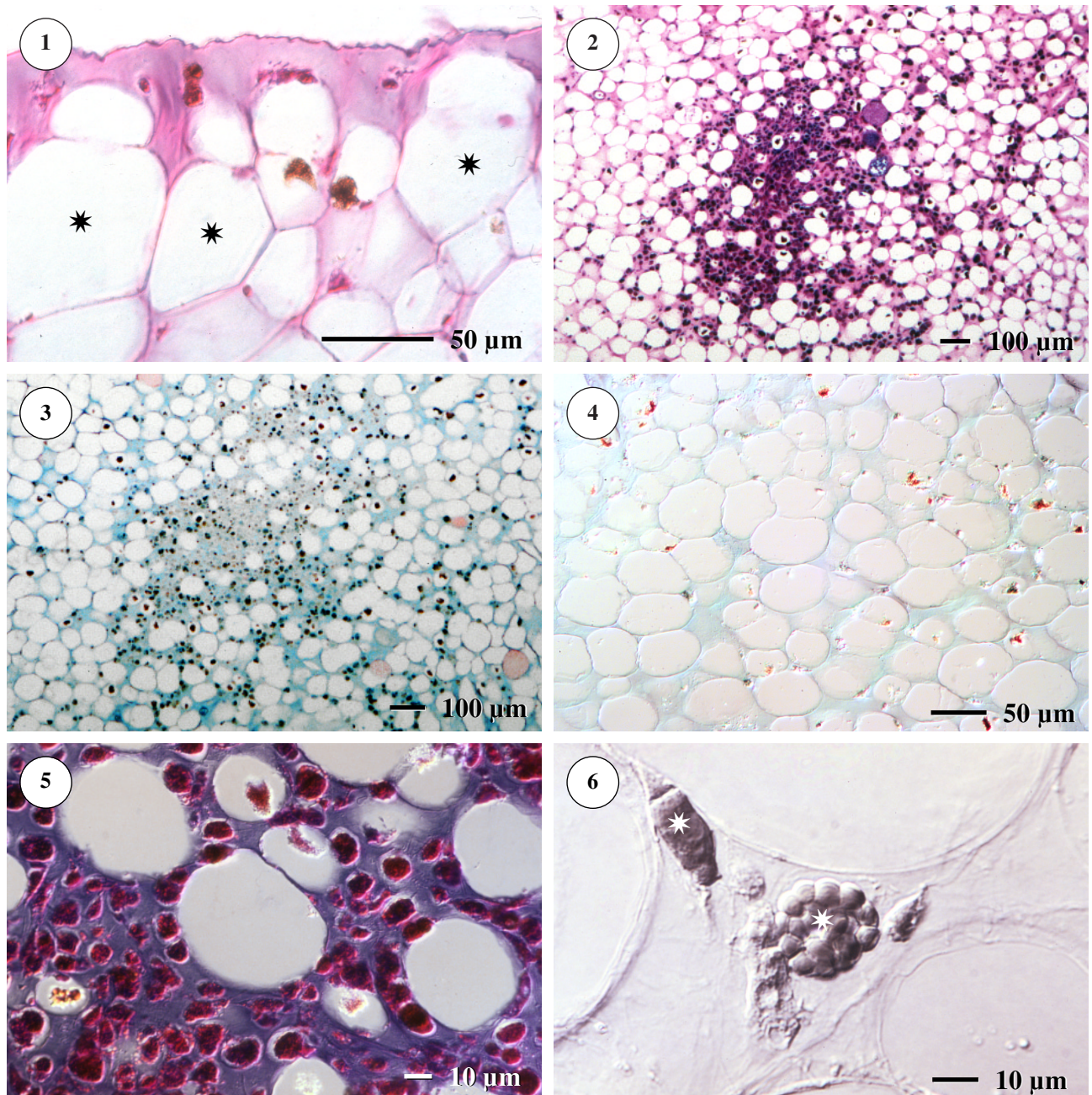
- 1a Kryo-REM-Aufnahme der Tunika-Fasermatrix einer violetten Kolonie. Die Fasermatrix füllt die Bereiche zwischen den Zellen vollständig aus. Zwischen den Fasern ist lamellenartiges, amorphes Material zu erkennen.
- 1b Detailaufnahme (Kryo-REM) der Fasermatrix einer violetten Kolonie.
- 2a Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (REM, Kryobrush nach TANAKA) der Fasermatrix einer violetten Kolonie. Die Fasern liegen in Streutextur.
- 2b Detailaufnahme (REM, Kryobrush nach TANAKA) der Fasermatrix einer violetten Kolonie. Die Fasern sind drehrund, gelegentlich sind Stränge paralleler Fasern zu beobachten.
- 3a Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (REM, Kryobrush nach TANAKA) der Fasermatrix einer grünen Kolonie. Die Fasern sind auch bei grünen Kolonien in Streutextur angeordnet.
- 3b Detailaufnahme (REM, Kryobrush nach TANAKA) der Fasermatrix einer grünen Kolonie. Die Fasern sind drehrund, zwischen bzw. an den Fasern ist granuläres Material erkennbar.



**Tafel 15****Tunika-Oberfläche und Abschlußschichten**

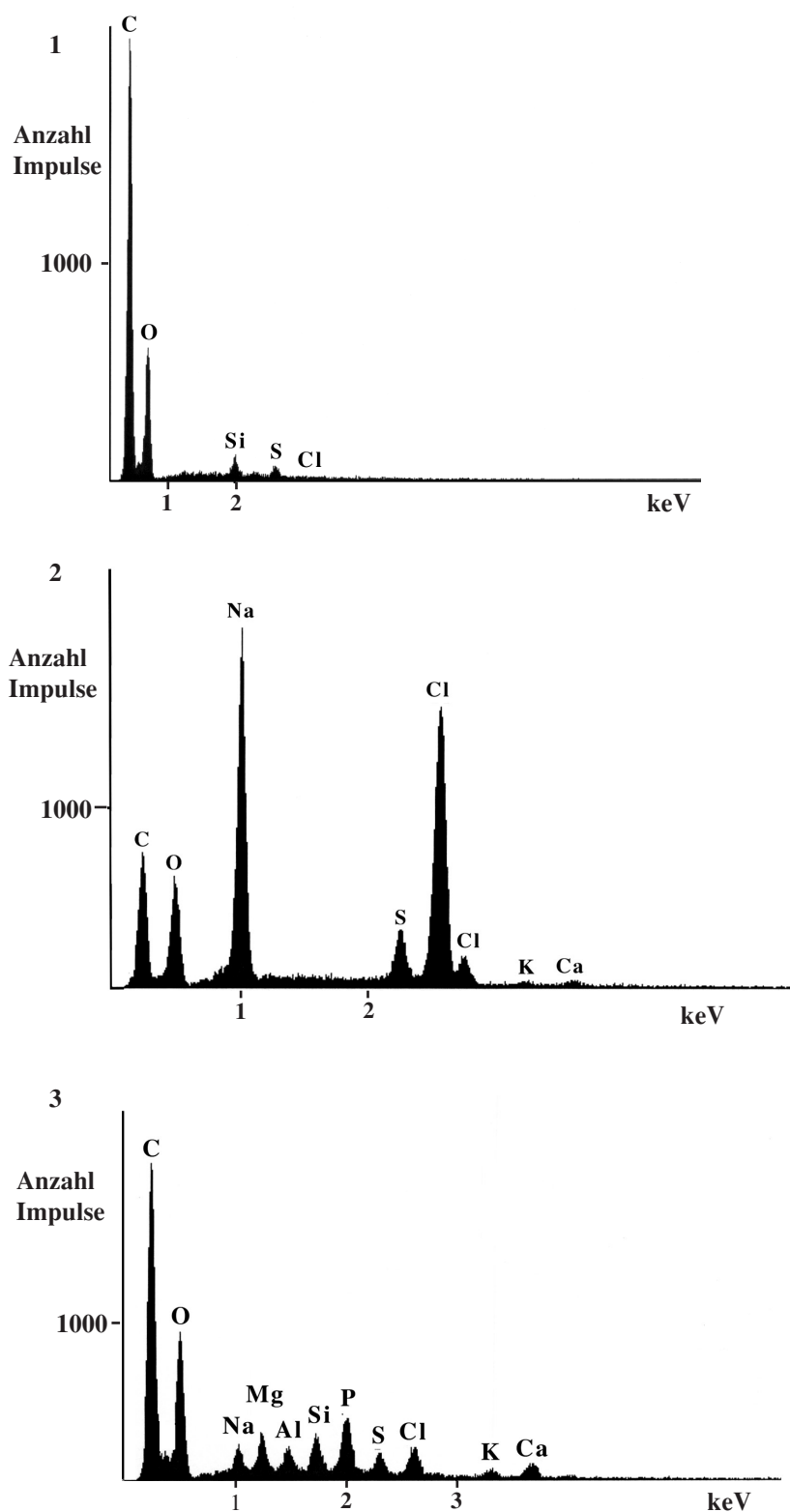
1. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (REM, konventionelle Fixierung) der Oberfläche einer violetten Kolonie von *C. dellechiaiei*. Die Oberfläche bildet große Falten (Pfeile).
2. REM-Aufnahme einer Kieselalge auf der Oberfläche einer mehrere Wochen lang gehälterten Kolonie. Die Alge ist in die obere Tunikamatrixschicht eingedrückt.
3. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (TEM, konventionelle Fixierung) der Cuticula einer frisch gesammelten Kolonie (Pfeil). Die Cuticula besitzt keine Papillen und ist unbewachsen.
4. TEM-Aufnahme der Cuticula (Pfeil) einer über mehrere Wochen gehälterten Kolonie. Auf der Cuticula wachsen zahlreiche Mikroorganismen (Sterne).
5. Kryo-REM-Aufnahme der obersten Tunikaschicht. Die Tunika wird von einer Schicht aus dichter angeordneten Matrixfasern und der Cuticula abgeschlossen (Pfeil). Die Tunikaprobe ist in Gefrierschutzlösung eingebettet (GS).
6. TEM-Aufnahme der obersten Tunikaschichten. Unterhalb der Cuticula liegt eine zellfreie Matrixschicht (Stern), darunter folgt eine Schicht mit zahlreichen granulären Filopodialen Zellen. Blasen zellen (BZ) sind erst 20–30 µm unterhalb der Kolonieoberfläche zu beobachten.



**Tafel 16**

Zusammensetzung der Tunikamatrix (Paraffinschnitte, LM, DIC)

1. Außenschichten der Tunika. Färbung: PAS-Reaktion. Die Cuticula und die darunterliegende Matrix sind besonders intensiv gefärbt. In der Tunika sind zahlreiche große Blaszellen sichtbar (Sterne).
2. Basale Bereiche der Tunika. Färbung: PAS, Toluidinblau. Die Tunikamatrix ist PAS-positiv, Blaszellen bleiben ungefärbt, kompartimentierte Zellen werden stark angefärbt.
3. Basale Bereiche der Tunika. Färbung: Alcianblau bei pH 2,5. Die Tunikamatrix ist Alcianblau-positiv, Blaszellen bleiben ungefärbt, kompartimentierte Zellen werden nur schwach angefärbt.
4. Tunikamatrix. Färbung: Alcianblau bei pH 1,0. Die Reaktion der Matrix mit Alcianblau bei pH 1,0 fällt schwächer aus als bei pH 2,5.
5. Tunikamatrix, Kombinationsfärbung aus PAS-Reaktion und Alcianblau (pH 2,5). Die Tunikamatrix ist in einem blauviolettten Mischton gefärbt. Die Tunikazellen reagieren nicht mit Alcianblau.
6. Tunikamatrix, Kontrastierung mit Osmiumtetroxid. Die Tunikazellen (Stern) reagieren im Gegensatz zur Tunikamatrix gut mit Osmiumtetroxid und erscheinen stärker kontrastiert.

**Tafel 17**

Energiedispersive Röntgenspektren von Matrix, Tunikaflüssigkeit und Zooidpreßsaft (REM, alle Proben mit Kohle bedampft)

1. EDX-Spektrum der Tunikamatrix (konventionelle Fixierung ohne Osmiumtetroxid).
2. EDX-Spektrum der abgesaugten Tunikaflüssigkeit (Violette Kolonie, s. Abschnitt 3.2.3).
3. EDX-Spektrum des Zooidpreßsaftes (s. Abschnitt 3.2.3).

### 3.2.2 Kontaktstellen zwischen Zooid und Tunika

#### Zooidhohlräume

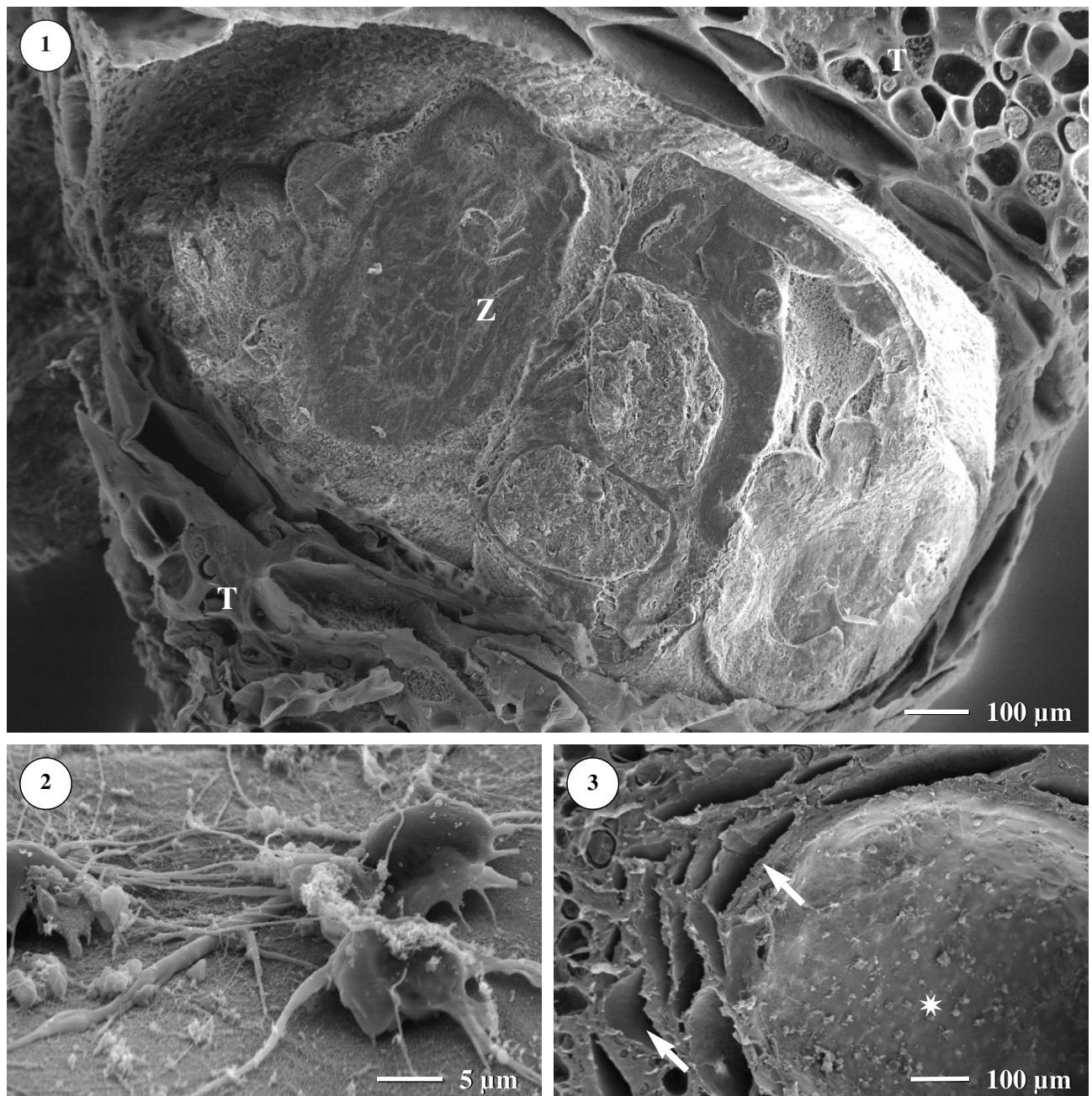
Die Hohlräume, in denen sich die einzelnen Zooide der Kolonie befinden, sind etwa eiförmig und haben an ihrer weitesten Stellen einen Durchmesser von etwa 0,6 mm. Manchmal sind die Kapseln an der Stelle, an der die Zooid-„*taille*“ (= Bereich zwischen Thorax und Abdomen) zu liegen kommt, etwas eingeschnürt. Die Höhe der Zooidhohlräume beträgt etwa 1,5 mm. Die Form der Hohlräume wird von zahlreichen scheibenförmigen Kalkschuppen begrenzt, die überlappend angeordnet sind und somit eine stabile Kapsel bilden (Tafel 18).

Der Zooidhohlraum wird zum Zooid hin von einer Abschlußschicht aus dichten Tunika-Matrixfasern ausgekleidet. Eine Cuticula ist nicht erkennbar. Die Zooide selbst liegen frei in den Hohlräumen und sind vermutlich nur im Abdomenbereich mit der Tunika verbunden. Zahlreiche filopodiale Zellen liegen auf der Abschlußschicht der Zooidraumwand, bzw. sind in sie eingebettet (s. Abschnitt 3.3.4; Tafel 18, Tafel 48). Außerdem können in der Abschlußschicht regelmäßig Morulazellen beobachtet werden, die aber nicht in den Zooidhohlraum durchdringen. Andere Zelltypen fehlen, sie sind erst wieder in 15–30 µm Entfernung vom Zooidhohlraum zu beobachten. Die Kalkschuppen liegen teilweise in der Abschlußschicht des Zooidhohlraums, brechen jedoch nicht ganz in den Zooidhohlraum durch, so daß sie bei REM-Innenaufnahmen des Zooidhohlraums nicht zu erkennen sind. Seitlich im unteren Drittel des Zooidhohlraums befinden sich in der Hohlraumwand je zwei siebartige Platten von 90–140 µm Durchmesser (Tafel 19). Die Poren der Platten haben einen Durchmesser von 4–5 µm. Die Platten bestehen aus faserigem Material (Form und Durchmesser wie Matrixfasern), zwischen den Fasern liegen aber auch vereinzelt globuläre Elemente. Da die Zooide bei der Präparation der Tunikaproben für das REM meist herausbrachen, konnte im REM kein direkter Kontakt zwischen Zooiden und Siebplatten beobachtet werden. Lichtmikroskopische Untersuchung von Schnitten aus den entsprechenden Bereichen zeigten jedoch immer wieder längliche Zooidzellen (vermutlich Muskelzellen) in der Nähe der Siebplatten (Tafel 19, Abb. 4).

#### Epidermis der Zooide

Die Zooidepidermis ist einschichtig und meist aus platten- bis schuppenförmigen Epithelzellen aufgebaut (Tafel 20, Abb. 1 und 2). Sie haben ovoide bis abgerundet-polygonale Form und einen Durchmesser von 15–20 µm. Die Zellen sind untereinander sehr stark verzahnt und bilden zahlreiche kurze Pseudopodien aus, mit denen sie aneinander haften. An manchen Stellen im Thorax- und Abdomenbereich sind die Epidermiszellen isoprismatisch, die Zellen erscheinen weniger flächig und stark aufgewölbt. An der tunika-seitigen Oberfläche der Epidermiszellen lassen sich häufig kurze, tropfenförmige Aus-sackungen der Plasmamembran beobachten. Besonders isoprismatische Epidermiszellen besitzen zahlreiche Ausstülpungen. An Kryobrush-Präparaten (TANAKA-Technik) läßt sich unterhalb der Zooidepidermis eine faserreiche Matrix (Faserdurchmesser 160 nm) erkennen (Tafel 20, Abb. 3 und 4). In diesem Bindegewebe liegen vereinzelt Zellen, darunter Zellen des filopodialen Typs, ähnlich den filopodialen Zellen der Tunika.



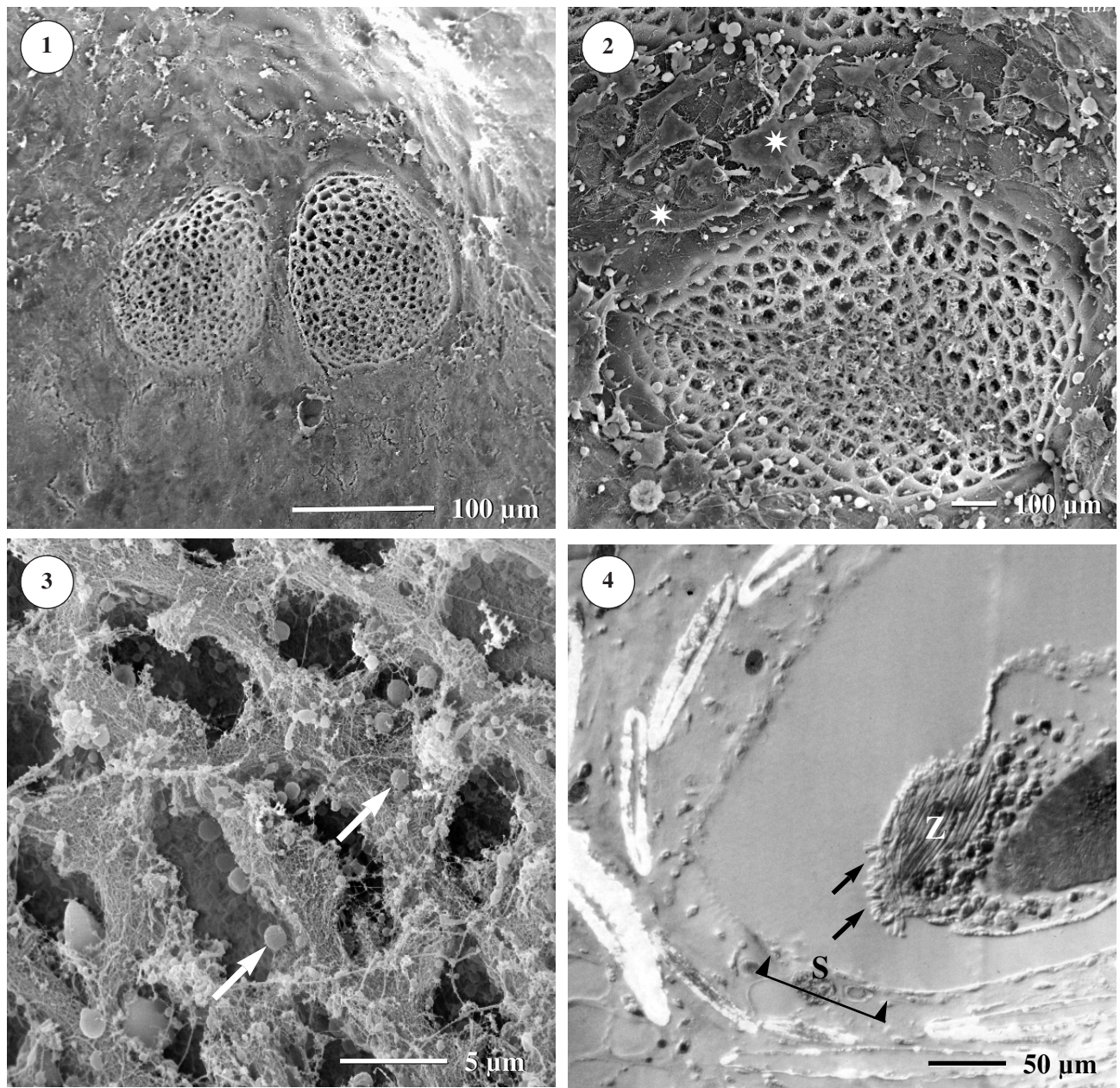


### Tafel 18

#### Zooidhohlraum (REM)

1. REM-Aufnahme eines Gefrierbruches (nach TANAKA) durch ein Zooid (Z) und die angrenzenden Tunikabereiche (T).
2. Filopodiale Zellen »bevölkern« die innere Wand des Zooidraums (REM, konventionelle Fixierung).
3. REM-Aufnahme eines Ausschnitts der Zooidkapsel. Der Zooidhohlraum (Stern) ist von einer dichten Matrixschicht umgeben, in die zahlreiche Kalkschuppen eingebettet sind. In dieser Probe sind die Kalkschuppen durch Tunikasäuren bereits herausgelöst bzw. herausgebrochen (Pfeile).



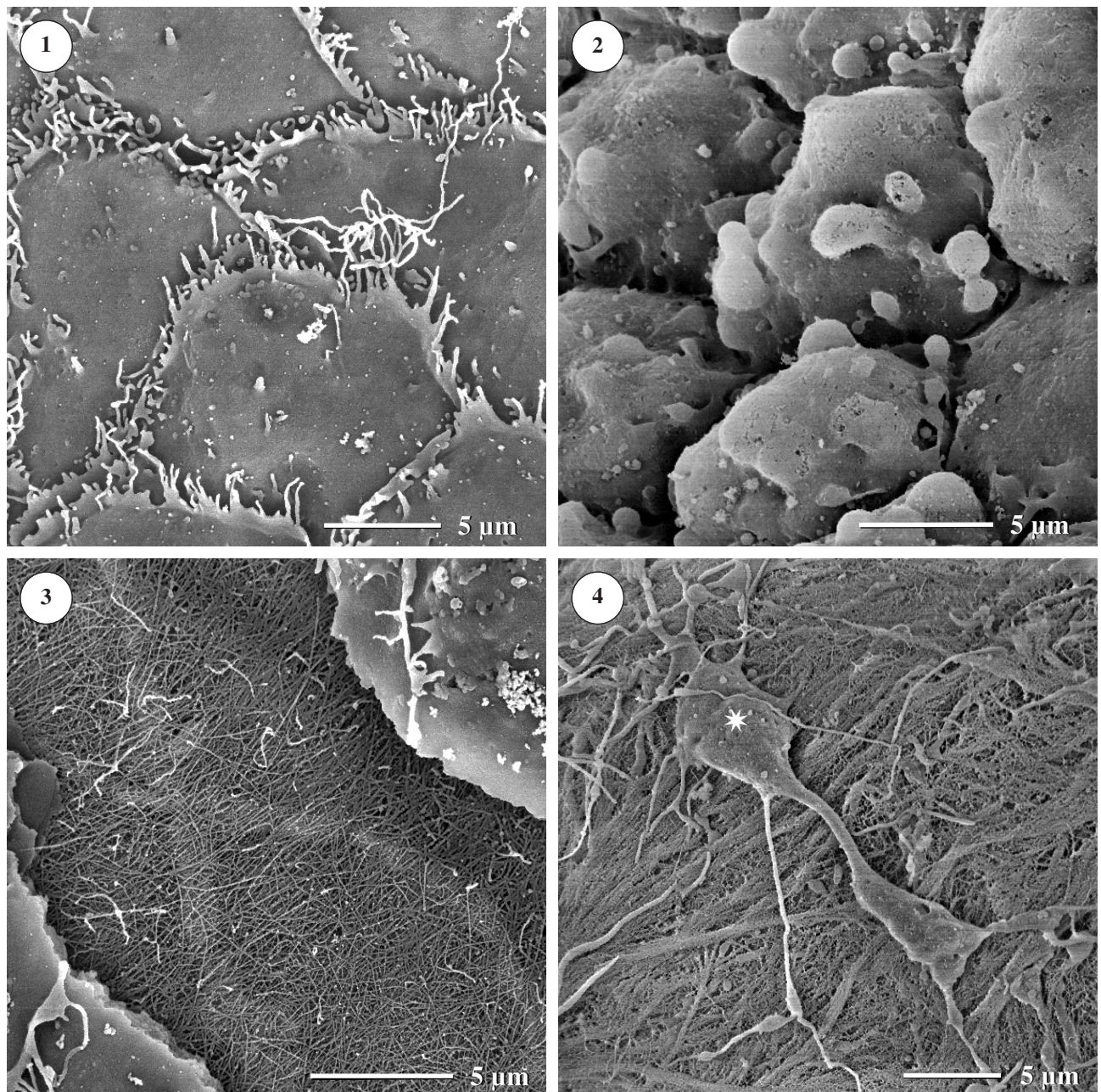


### Tafel 19

#### Siebplatten

1. REM-Aufnahme der unteren (basalen) Hälfte eines Zooidhohlraums (violette Kolonie). Die Siebplatten sind paarig und liegen immer direkt nebeneinander.
2. REM-Aufnahme einer einzelnen Siebplatte. In der Umgebung sind zahlreiche filopodiale Zellen zu erkennen (Sterne).
3. Detailaufnahme einer Siebplatte (REM). Die Stege werden von Tunika-Matrixfasern und dazwischen liegenden Globuli (Pfeile) gebildet.
4. LM-Aufnahme (DIC, Probe osmiumbehandelt) des Siebplattenbereichs. S = Siebplatte, Z = Zooid. Am Zooid sind zahlreiche längliche Zellen zu erkennen, mit denen das lebende Zooid vermutlich in der Siebplatte verankert ist (Pfeile).





### Tafel 20

Zooidepidermis (REM, konventionelle Fixierung)

1. Plattenförmige Zellen der Zooidepidermis. Die Zellen sind flach und über zahlreiche Pseudopodien verbunden.
2. Isoprismatische Zellen der Zooidepidermis. Die Zellen sind stark aufgewölbt und bilden tropfenförmige Protrusionen aus.
3. Unterhalb der Zooidepidermis ist eine faserige Bindegewebsschicht erkennbar. Die Fasern dieses Bindegewebes sind wesentlich dicker als die der Tunikamatrix (Faserdurchmesser ca. 160 nm).
4. Im Zoooid-Bindegewebe sind filopodiale Zellen (Stern) nachweisbar, die denen der Tunika ähneln.

### Tunikakanäle und Öffnungen

Die Zooide von *C. dellechiaiei* sind etwa 1–2 mm tief in die gemeinsame Tunika eingesenkt. Von außen sind, bei frisch gesammelten Tieren, nur Öffnungen zu sehen, die von Tunikagewebe gebildet werden. Die Atrial- und Branchialöffnungen der einzelnen Zooide befinden sich nicht direkt an der Oberfläche der Kolonie, so daß die Verbindung des Zooids zum Meerwasser hin durch einen nach außen führenden Kanal hergestellt wird. Kollektive Atrialkanäle und -höhlräume, wie sie für andere Ascidienarten (z.B. *Botryllus schlosseri*, s. WESTHEIDE und RIEGER 1996) beschrieben wurden, konnten bei *C. dellechiaiei* nicht nachgewiesen werden. Die Zooide strecken sich zur Nahrungsaufnahme weit in den Tunikakanal und reichen im voll expandierten Zustand vermutlich bis knapp unter die Tunikaoberfläche heran.

Ganz frisch gesammelte und noch am Sammelort fixierte Kolonien wiesen an der Oberfläche zahlreiche 6-lappige Öffnungen auf (Tafel 21). Diese stellen den Eingang der durch die Tunika zu den Zooiden verlaufenden Kanäle dar und sind in Abständen von 1–2 mm über die freiliegende Tunikaoberfläche verteilt. Bei der Unterwasser-Vermessung unbeeinflusster *C. dellechiaiei*-Kolonien am Standort konnten häufig sehr große Öffnungen (Durchmesser bis 1 mm) beobachtet werden.

Die Struktur der Öffnungen konnte im REM dargestellt werden. Es handelt sich um kreisförmige Poren, die von einem Ring aus 6 spitz zulaufenden Segmenten begrenzt werden. Die Segmente sind wie Tortenstücke um den zentralen Porus herum angeordnet. Die Größe des Porus, und damit der Abstand der einzelnen Segmente untereinander, variiert von Zooid zu Zooid. Verschiedene Öffnungsstadien konnten beobachtet werden: Bei einigen Kanälen waren die Poren relativ weit geöffnet, der Porendurchmesser betrug ca. 200 µm, die einzelnen Gewebesegmente waren 20–30 µm voneinander entfernt. Manche Poren wiederum sind fast geschlossen, hier liegen die Gewebesegmente eng aneinander und verkleinern so den Porus. Völlig geschlossene Poren konnten ebenfalls im REM dargestellt werden. Die ursprünglichen, nach oben aufgewölbten Gewebesegmente werden abgebaut, der Grundriß der Segmente kann nur noch an kleineren Falten und Vorsprüngen der Cuticula nachvollzogen werden.

Die Cuticula in unmittelbarer Umgebung offener Poren war zumeist auffallend faltenfrei (Tafel 21, Abb. 2). Erst in einiger Entfernung von den Poren, bzw. bei offensichtlich völlig verschlossenen und zurückgebildeten Öffnungen konnten wieder Cuticulafalten nachgewiesen werden (Tafel 21, Abb. 4).

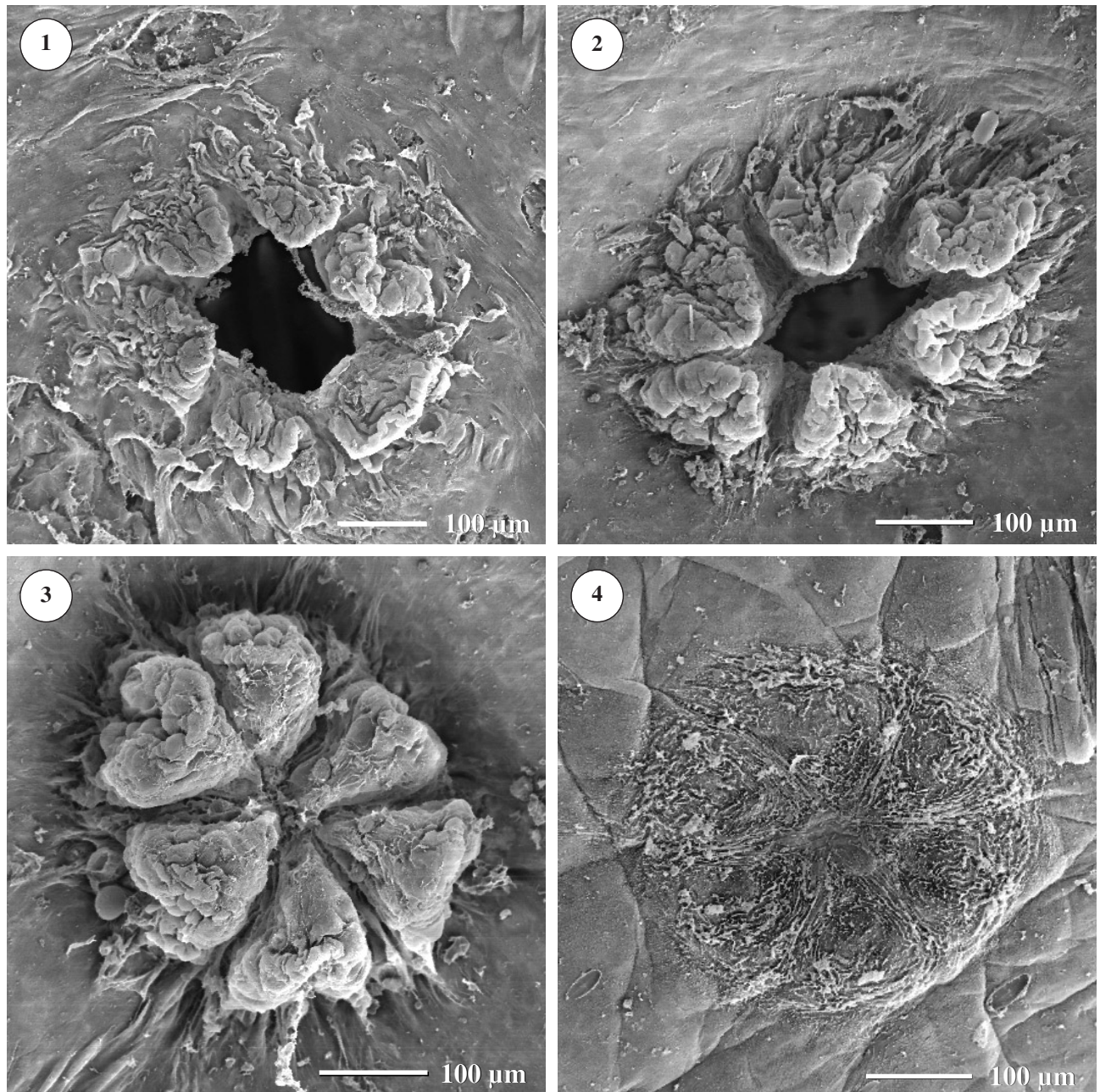
Die Veränderungen der Öffnungen begannen bereits nach wenigen Stunden Hälterungsdauer, also meist noch während des Transports der Tiere von Spanien nach Deutschland. Nur bei sehr schnell und unter optimalen Bedingungen durchgeführtem Transport blieben die Öffnungen etwa 3 Tage makroskopisch sichtbar. Da diese Phänomene erst im Verlauf der Arbeit durch die zunehmende Kenntnis der Tunikastrukturen klar wurden, konnten nur wenige Kolonien mit intakten Öffnungen untersucht werden.

Ebenso veränderlich wie die Öffnungen an der Tunikaoberfläche zeigte sich die Struktur der Tunikakanäle. Die Tunikakanäle werden nach außen hin von den 6-lappigen Öffnungen begrenzt. Proximal münden die Tunikakanäle in die Zooidhohlräume. Sie stellen daher die Verbindung der Zooide zur Meerwasserumgebung dar, bei geöffneten Poren werden sie von Meerwasser durchspült. Der Durchmesser der Kanäle betrug bei direkt am Sammelort fixierten Kolonien ca. 200–500  $\mu\text{m}$ .

Die Randschicht der Tunikakanäle wird, wie die Außenschicht der ganzen Kolonie, von einer dünnen, zellfreien Schicht Tunikamatrix gebildet (Tafel 22, Abb. 3). Darunter schließt sich Tunikagewebe mit verschiedenen Zelltypen an. In der Nähe der Kanalwände sind auffallend viele Pigmentzellen eingebettet. Makroskopisch ist dies bereits als intensiv pigmentierter, ringförmiger Bereich um die Kanäle frisch aufgeschnittener Kolonien zu erkennen (Tafel 22, Abb. 1 und 2).

Auch die Tunikakanäle werden, wie die Poren an der Tunikaoberfläche, mit zunehmender Hälterungsdauer immer weiter zurückgebildet: Sie werden von Tunikagewebe vollständig verschlossen und sind bei 1–2 Wochen gehälterten Kolonien auch mit mikroskopischen Techniken (Paraffin–Serienschnittuntersuchung, Rasterelektronenmikroskopie gebrochener Proben) nicht mehr nachweisbar. Offensichtlich stellen mit zunehmendem Verschluß ihrer Versorgungswege die Zooide auch die Nahrungsaufnahme ein: Mit Farbstoffen (Nilblausulfat bzw. Ölrot) markiertes Futter konnte zwar im Umgebungswasser, nicht aber in den Kolonien nachgewiesen werden. Die Vitalität der Kolonien und die Art und Verteilung der Tunikazellen wurde dadurch aber nicht beeinträchtigt.

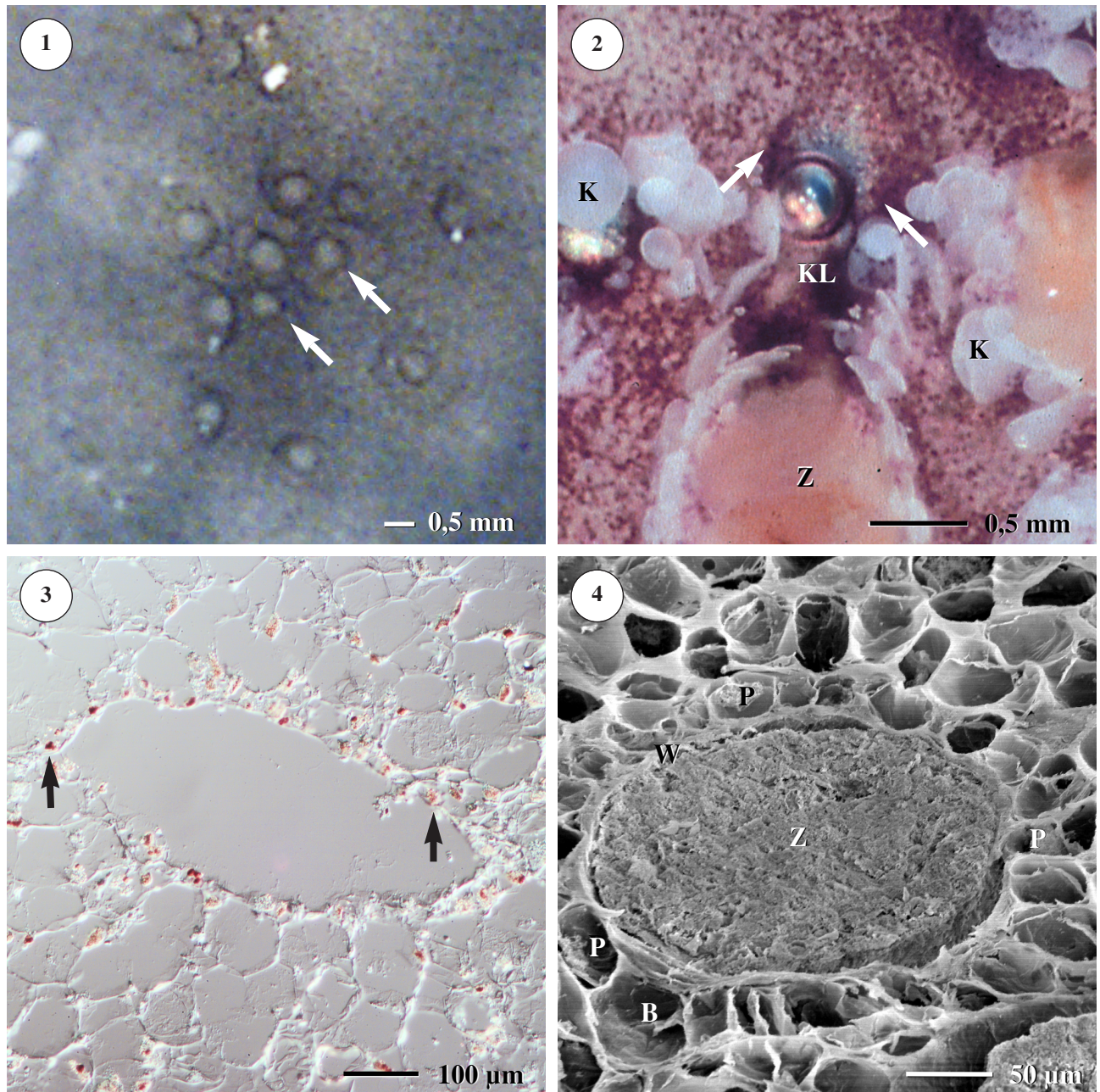


**Tafel 21**

Öffnungen an der Tunikaoberfläche (REM, konventionelle Fixierung)

1. Die Öffnungen an der Oberfläche der Kolonien werden von sechs Gewebesegmenten begrenzt und bilden den Abschluß der Tunikakanäle.
2. Beim Schließen des Porus rücken die Segmente näher zusammen.
3. Verschlüssener Porus.
4. Nach 5–8 Tagen werden die Gewebesegmente abgebaut.





## Tafel 22

### Tunikakanäle

1. Stereomikroskopische Aufnahme einer grünen Kolonie von *C. dellechiaiei*. Die Tunikakanäle sind an ihrer stärker pigmentierten Wand zu erkennen (Pfeile).
2. Stereomikroskopische Aufnahme einer aufgeschnittenen violetten Kolonie (Ausschnittvergrößerung von Abb. 1, Tafel 7). Auch in violetten Kolonien sind die Wandbereiche der Tunikakanäle stärker pigmentiert (Pfeile). Im Kanallumen (KL) liegt eine Gasblase, die durch Auflösung von Kalkschuppen entstanden ist. Z = Zooid, K = Kalkschuppen.
3. LM-Aufnahme eines Paraffinschnittes durch einen Tunikakanal. Nahe der Kanalwand sind zahlreiche Pigmentzellen erkennbar (Pfeile).
4. REM-Aufnahme eines Kryobruches (Technik nach TANAKA) durch einen Tunikakanal. Das Lumen des Kanals ist hier mit Zooidgewebe (Z) gefüllt. Die Kanalwand (W) wird von Tunikamatrix-Material gebildet. Nahe der Kanalwand sind Pigmentzellen (P) und Blasenzellen (B) zu erkennen.

### Vitalität der Kolonien

Aufgrund der vorangehend beschriebenen Veränderungen der Kolonien im Aquarium schien es angebracht, die Vitalität der gehälterten Kolonien zu überprüfen. Bei den Zooiden konnte, auch nach mehrmonatiger Hälterung der Kolonien im Aquarium, das schlagende Herz, der Blutkreislauf und starke Kontraktion der Längsmuskulatur („squirting“) bei Entnahme aus der Kolonie beobachtet werden. Dies diente als Nachweis der Vitalität der Zooide. Ebenso reagierten frisch entnommene Zooide deutlich positiv mit Fluoresceindiaceetat. Besonders die Zooidepidermis mit ihrer hohen Zelldichte zeigte starke grüne Fluoreszenz (Tafel 23, Abb. 1), ebenso die Blutzellen im Hämocoel. Mit Acridinorange gefärbtes Zooidblut zeigte die für vitale Zellen charakteristische Grünfluoreszenz des Kerns bei roter Fluoreszenz des Cytoplasmas (Tafel 23, Abb. 2).

Acridinorange-Behandlung bewirkte bei den Kernen der Tunikazellen Grünfluoreszenz, während das Cytoplasma körnig rot fluoreszierte (Tafel 23, Abb. 3). Auch hier war die Fluoreszenz des Cytoplasmas nur bei den filopodialen Zellen gut zu erkennen. Auffallend stark reagierten die Morulazellen mit Acridinorange. Zwar blieb hier der Zellkern häufig nur schwach gefärbt, aber die Granula zeigten starke hellrote bzw. grüne Fluoreszenz (Tafel 23, Abb. 5 und 6). Hierbei erschienen die Granula mancher Zellen grün, die anderer Zellen rot, aber es traten auch Zellen mit roten und grünen Granula auf.

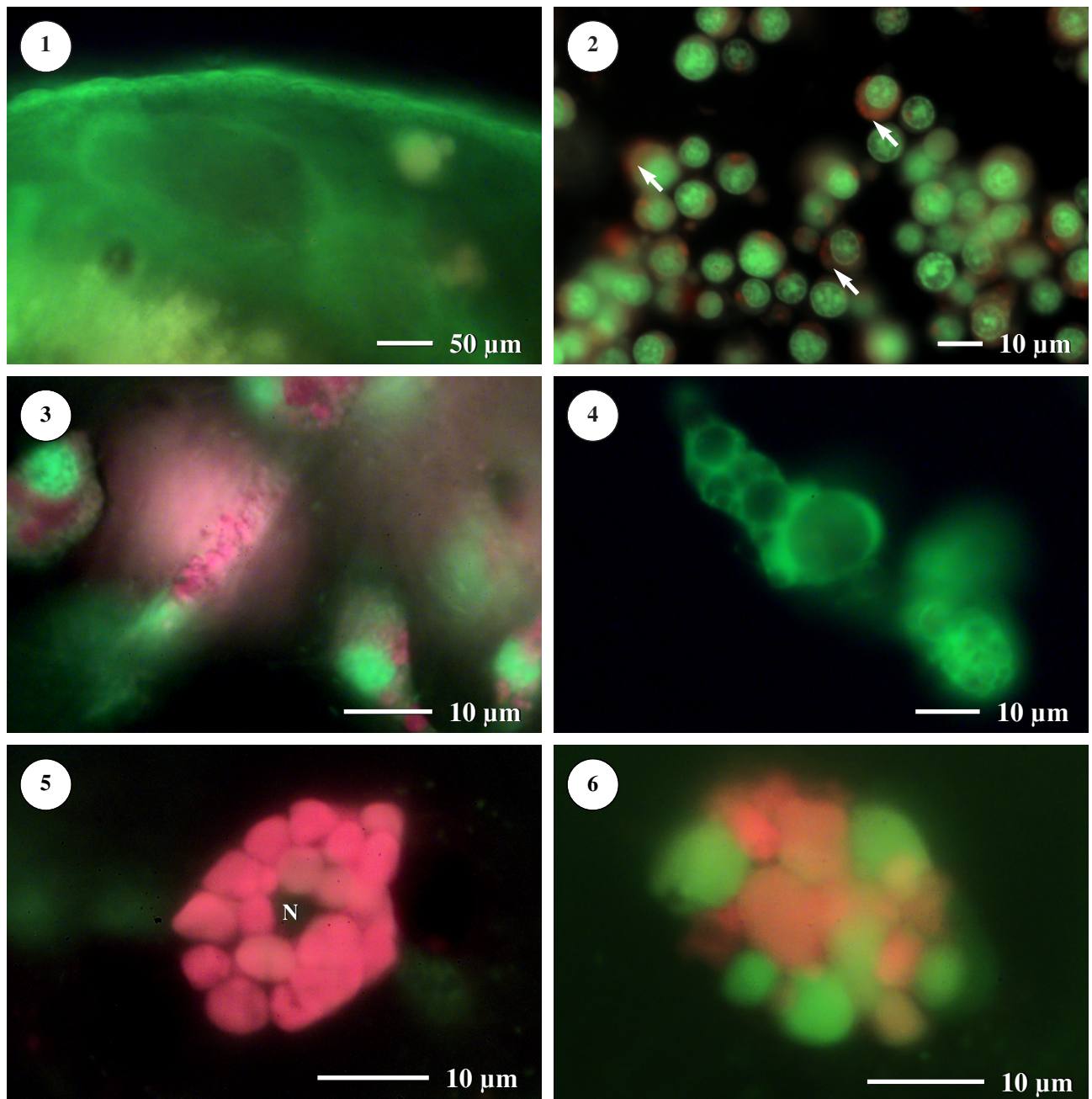
Die Vitalfärbung von Tunikagewebe mit Fluoresceindiaceetat lieferte für die plasmareichen filopodialen Zellen positive Ergebnisse: die Zellen fluoreszierten deutlich grün (Tafel 23, Abb. 4), Fluoreszenz außerhalb der Zellen wurde nicht beobachtet. Bei den plasmaärmeren übrigen Tunikazellen war die Fluorescein-Fluoreszenz meist nur schwach. Zum Vergleich wurden auch tiefgekühlte bzw. fixierte Gewebe von *C. dellechiajei*-Kolonien mit Fluoresceindiaceetat behandelt. Hier war keine Grünfluoreszenz im Plasma nachweisbar.

### 3.2.3 Untersuchung von Tunikaflüssigkeit und Zooid-Presssaft

Bereits bei der Präparation frischer, unfixierter Tunikastücke von *C. dellechiajei* konnte sofortige Bildung von Gasblasen bei gleichzeitiger Auflösung von Kalkschuppen beobachtet werden (Tafel 7, Abb. 1). Beim Zerteilen von zuvor im Ganzen fixierten Kolonien blieb diese Gasbildung jedoch aus, da der Fixierungspuffer (pH 7,0) die Säuren sofort neutralisierte. Um das Vorhandensein von Säuren in der Tunika zu überprüfen, wurden daher die bei Verletzung der Gewebe austretenden Flüssigkeiten untersucht.

Aus der Tunika frischer violetter *C. dellechiajei*-Kolonien gewonnene Flüssigkeit hat eine rotviolette Farbe. Tunikaflüssigkeit aus frischen grünen Kolonien ist gelbgrün. Der pH-Wert der Flüssigkeit beider Farbvarianten liegt bei 1–1,5. Die Flüssigkeit enthält Sulfat und Chloridionen (Nachweis als BaSO<sub>4</sub> und AgCl<sub>2</sub>). Die Osmolalität der Tunikaflüssigkeit beträgt etwa 1,1 Osmol / kg und entspricht damit etwa der Osmolarität von Meerwasser (1 Osmol / l). Wie die Gewebe der meisten marinen Invertebraten (BURTON 1983) ist daher auch die Tunika von *C. dellechiajei* etwa isoosmotisch zur Meerwasserumgebung.



**Tafel 23**

Vitalitätstest (Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie).

1. Zooidepidermis, Fluoresceindiacetatfärbung. Die Fluoreszenz zeigt die Vitalität des Zooids an.
2. Zooidblut, Acridinorangefärbung. Das Cytoplasma fluoresziert schwach dunkelrot (Pfeile), der Zellkern grün (charakteristische Fluoreszenz vitaler Zellen).
3. Granuläre filopodiale Zellen in der Tunika, Acridinorangefärbung. Die Granula im Cytoplasma zeigen rote, der Zellkern grüne Fluoreszenz.
4. Vakuolierte filopodiale Zelle in der Tunika, Fluoresceindiacetatfärbung.
5. Morulazelle in der Tunika, Acridinorangefärbung. Der Zellkern (N) fluoresziert grün, die Granula rot.
6. Morulazelle in der Tunika, Acridinorangefärbung. Die Fluoreszenz der Morulazellen ist sehr inhomogen. Der Zellkern (N) fluoresziert grün, die Granula rot oder grün. Da Morulazellen auch autonom fluoreszieren, stammt ein Teil des Fluoreszenzlichtes von zelleigenen Verbindungen.



Flüssigkeit aus fixierten, braun gewordenen Kolonien ist farblos bis hell gelblich. Der pH-Wert liegt bei 7–8. Gleiches gilt für Flüssigkeit aus Kolonien, die (per Post verschickt) den Transport nicht überlebt hatten und daher bereits braun verfärbt in München ankamen. EDX–Untersuchung von Tunikaflüssigkeit aus frischen Kolonien zeigte die Anwesenheit von großen Mengen an Schwefel, Sauerstoff, Calcium und Kohlenstoff sowie geringeren Mengen an Natrium und Chlor (s. Tafel 17, Abb. 2).

Der Presssaft aus isolierten Zooiden von *C. dellechiaiei* ist gelblich und hat einen pH-Wert von 7,0. Im Unterschied zur Tunikaflüssigkeit enthält er neben Kohlenstoff, Sauerstoff, Calcium, Schwefel, Natrium und Chlor auch Stickstoff, Phosphor, Silicium, Kalium und Magnesium (s. Tafel 17, Abb. 3).

### 3.2.4 Struktur der Kalkschuppen

Scheibenförmige Kalkschuppen in kapselförmiger Anordnung um die Zooide herum sind ein charakteristisches Merkmal der Gattung *Cystodytes* und werden auch als taxonomisches Kriterium im 1972 von MONNIOT und MONNIOT aufgestellten Bestimmungsschlüssel für die Ascidiengattungen herangezogen (MONNIOT 1970, MONNIOT und MONNIOT 1972b).

Der Durchmesser der Kalkschuppen variiert von 100 bis 500 µm. In der Mitte sind die Kalkschuppen etwa 15–20 µm dick, zu den Rändern hin werden sie flacher, der äußere Rand der Schuppe ist jedoch wieder etwas verdickt und abgerundet (Tafel 24, Abb. 3). Die Schuppen sind häufig etwas aufgewölbt, so daß sie im Querschnitt flach sichelförmig erscheinen. Diese Form trägt vorteilhaft dazu bei, eine ovoide Zooidkapsel aus überlappenden Schuppen zu bilden (Tafel 24, Abb. 1). In der Zooidkapsel sind die einzelnen Schuppen mehrschichtig angeordnet. Zwischen den einzelnen Schuppen sind Tunikafasern, aber auch filopodiale Zellen und Morulazellen zu finden.

### Ultrastruktur der Kalkschuppen

In quer gebrochenen Kalkschuppen ist ein zylinder– bis scheibenförmiger, zentraler Hohlraum erkennbar (Tafel 24, Abb. 3 und 4), der lockeres, faseriges Material enthält. Auf diesen Hohlraum aufgelagert sind mehrere Schichten aus länglichen Kalknadeln (Tafel 25, Abb. 1). In der Nähe des zentralen Hohlraums finden sich nur kleine, häufig rosettenförmig angeordnete und in alle Richtungen weisende Kalknadeln. In den peripheren Bereichen der Kalkschuppen sind die Kalknadeln viel größer und meist strahlenförmig zum Mittelpunkt der Schuppe hin ausgerichtet (Tafel 25, Abb. 1 u. 3). An den Rändern der Kalkschuppen verschmelzen die einzelnen Nadeln häufig zu plattenförmigen Komplexen.

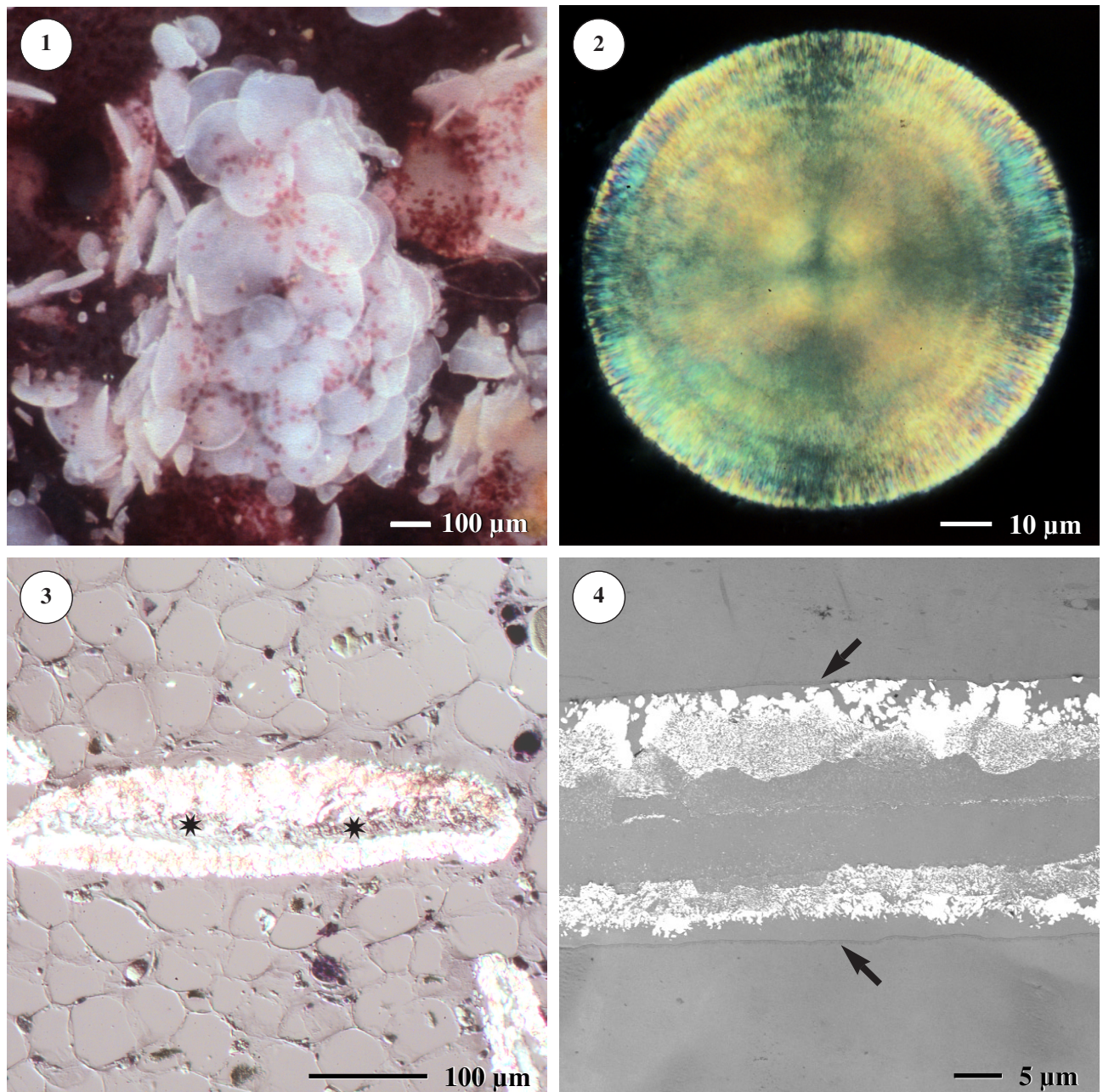
Die Kalkschuppen liegen in einer membranösen Tasche (vermutlich zellulären Ursprungs), die sie zur Tunikamatrix hin abgrenzt und bei der Präparation zurückbleibt, wenn die Kalkkristalle herausbrechen oder aufgelöst werden (Tafel 24, Abb. 4; Tafel 25, Abb. 2).

Mit der Kryo–Rasterelektronenmikroskopie (Kryo–REM) stand eine Technik zur Verfügung, Kalkschuppen unbeeinflusst von den aus den Tunikazellen austretenden Säuren zu untersuchen. An in gefrorenem Zustand gebrochenen Proben konnte die Struktur der einzelnen Kalknadeln dargestellt werden. Jede Nadel besteht aus einer äußeren Schicht aus Kalk und einem zentralen Kern aus vermutlich organischen Fasern (Tafel 25, Abb. 4).

### **Zusammensetzung der Kalkschuppen**

Die Schuppen sind auflösbar in konzentrierter Salzsäure, Schwefelsäure und Essigsäure, ebenso lösen sie sich bei der konventionellen Präparation von *C. dellechiaiei*–Kolonien wegen der in der Tunika befindlichen Säuren teilweise oder vollständig. Hierbei bilden sich Gasbläschen, vermutlich aus Kohlendioxid.

Die Nadeln bestehen ihrerseits aus 2 chemisch verschiedenen Komponenten: Der Kern der Nadeln ist eine lockere, aus Fasern aufgebaute Matrix mit zahlreichen sehr kleinen, kugelförmigen Einschlüssen (Tafel 25, Abb. 4). Der Außenbereich der Kalknadeln besteht aus Calciumcarbonat. Calcium, Kohlenstoff und Sauerstoff können mittels EDX–Analyse nachgewiesen werden (Tafel 25, Abb. 5).

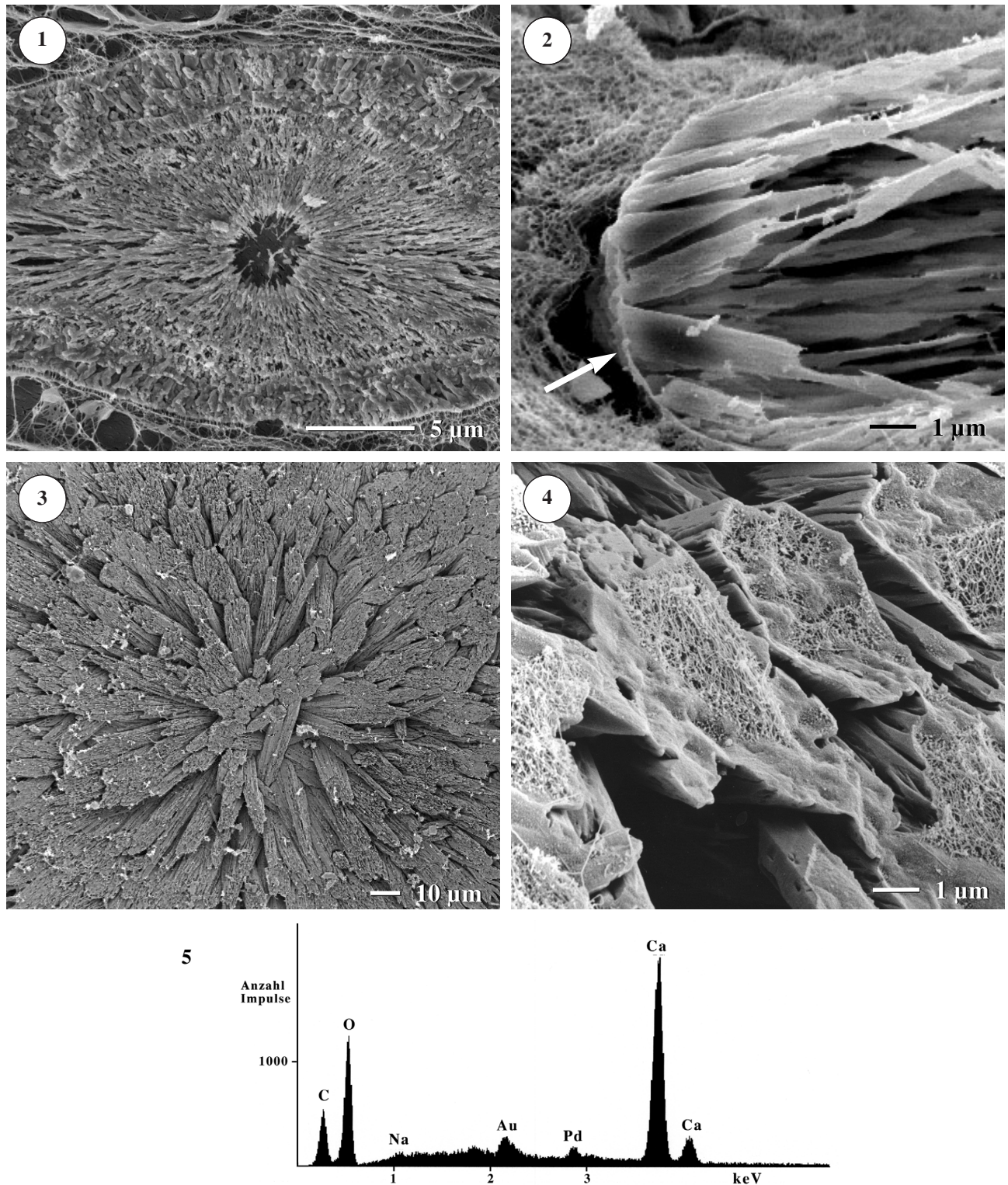


### Tafel 24

#### Kalkschuppen

1. Stereomikroskopische Aufnahme einer Zooidkapsel (violette Kolonie). Die Kapsel wird von überlappend angeordneten Kalkschuppen gebildet.
2. Kalkschuppe von *C. dellechiaiei* (LM, DIC).
3. LM-Aufnahme eines Querschnitts (Paraffinschnitt) durch eine Kalkschuppe. Im Inneren der Kalkschuppe ist ein Hohlraum (Sterne) zu erkennen (Färbung: Toluidinblau, Osmiumtetroxidfixierung; DIC)
4. TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnitts durch eine Kalkschuppe. Die Kalkschuppe wird von Schichten kristallinen Materials gebildet und ist von einer Membran umgeben (Pfeile).



**Tafel 25****Kalkschuppen (REM)**

1. Kryo-REM-Aufnahme eines Gefrierbruchs durch eine Kalkschuppe. Das Zentrum der Schuppe ist hohl.
2. Die aus Kalknadeln aufgebaute Schuppe ist von einer membranösen Tasche umgeben (Pfeil). (REM, konventionelle Fixierung).
3. Die Kalknadeln strahlen vom Zentrum der Schuppe zu den Rändern hin aus (REM, konventionelle Fixierung).
4. Im Inneren der einzelnen Nadeln befindet sich eine faserige, organische Matrix (Kryo-REM).
5. EDX-Spektrum (Kryoprobe) einer Kalkschuppe (Au/Pd-Signale stammen von der Sputterschicht).

### 3.3 Tunikazellen

In der Tunika von *C. dellechiaiei* können neben der extrazellulären Fasermatrix lichtmikroskopisch sechs verschiedene Typen von Tunikazellen unterschieden werden. Zum Teil sind sie intensiv gefärbt (Pigmentzellen, kompartimentierte Zellen), zum Teil aber auch farblos–transparent (Blasenzellen, Morulazellen, granuläre und vakuolisierte filopodiale Zellen). Da bei einigen dieser Zelltypen zunächst nicht klar war, ob es sich um wirkliche Zellen oder um azelluläre Elemente handelt, wurde zunächst eine eindeutige Darstellung der Zellkerne mit Hilfe einer gut kontrastierenden Kernfärbung angestrebt. Dies konnte für alle Zelltypen mittels einer Hämatoxylinvariante erreicht werden. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde der Zellcharakter der Tunikazellen auch durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt: in allen Zelltypen konnten Zellkerne, Plasmamembran und verschiedene Zellorganellen nachgewiesen werden.

#### 3.3.1 Blasenzellen

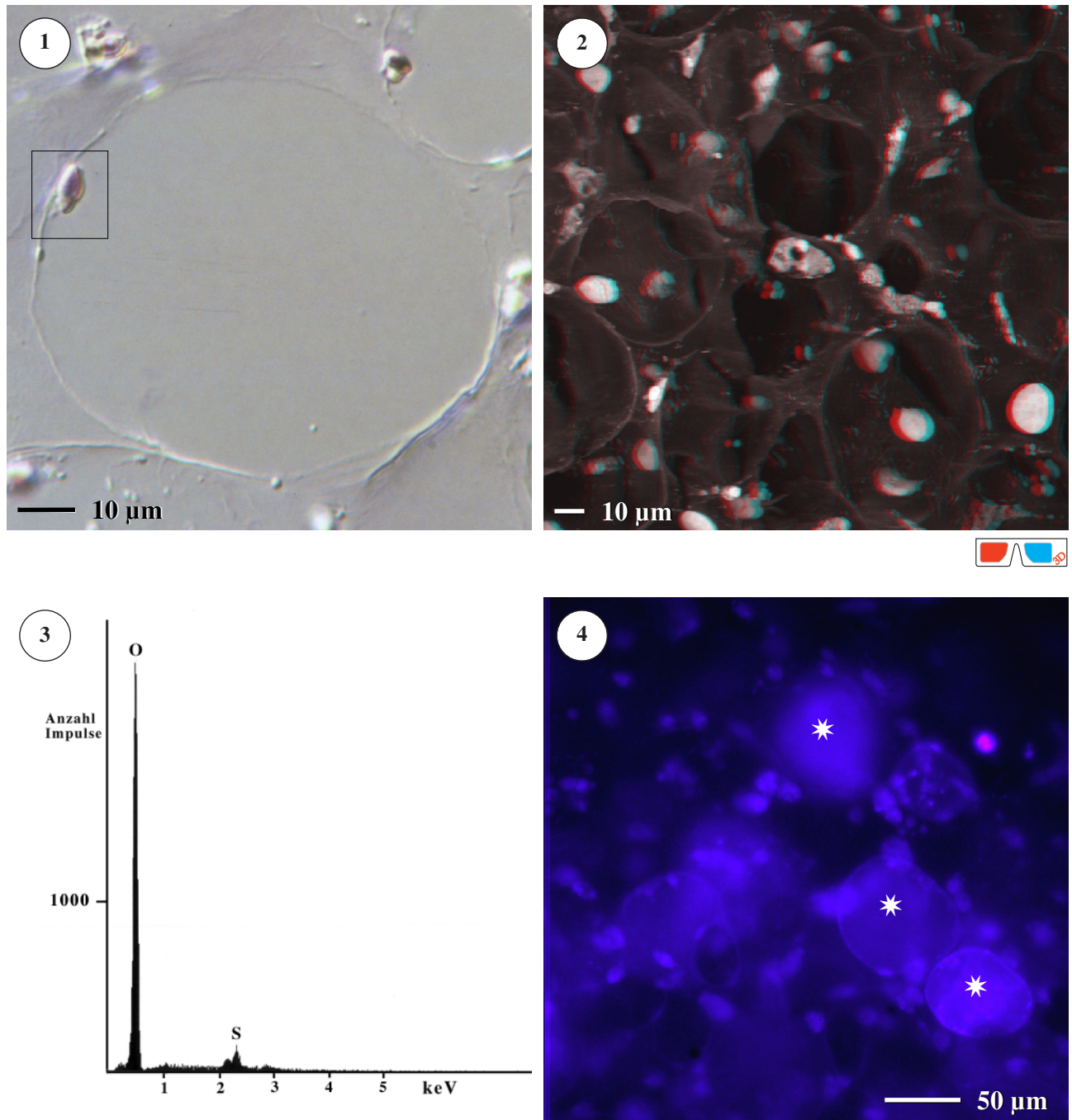
##### Struktur der Blasenzellen

Blasenzellen sind der häufigste und größte Zelltyp in der Tunika von *C. dellechiaiei*. Sie liegen dicht gedrängt in allen Tunikabereichen (mit Ausnahme der Abschlußschichten) und bilden das Hauptvolumen des Tunikagewebes (Tafel 13, Abb. 1–4). Ihr Durchmesser beträgt 40–120 µm, im Durchschnitt sind sie etwa 60 µm groß (Tafel 26, Abb. 1 und 2). Die Zellen besitzen eine sehr große, komplett flüssigkeitsgefüllte, lichtmikroskopisch farblos–transparente Vakuole und nur einen sehr schmalen Cytoplasmasaum, der im LM nur im Bereich des Zellkerns erkennbar ist (Tafel 28, Abb. 1). Im TEM an Ultradünnschnitten sind im Cytoplasma gelegentlich elektronentransparente Vesikel nachweisbar (vgl. Vesikel im Plasma der Pigmentzellen, s. Abschnitt 3.3.2 und Tafel 33, Abb. 1). Die Zelle hat etwa die Form einer Kugel, was auf einen hohen Turgordruck des flüssigen Vakuoleninhalts schließen lässt. Die Vakuole ist elektronentransparent. An der Stelle im Cytoplasma, an der der Zellkern liegt, erweitert sich der cytoplasmatische Raum auf etwa 3–4 µm, an den übrigen Stellen ist er oft nur ca. 30 nm breit. Der Zellkern ist linsenförmig, die Länge beträgt etwa 5 µm, die Breite 2–3 µm. Bei der Präparation (Fixierung und Entwässerung) schrumpfen die Blasenzellen kaum. In chemisch fixierten oder in Kryoproben liegt die Plasmamembran eng der umgebenden Tunikamatrix an (Tafel 29, Abb. 1). Die Innenseite des Tonoplasten erscheint bei mit der TANAKA–Technik aufgebrochenen Blasenzellen glatt, nur im Bereich des Zellkerns ist der Tonoplast etwas nach innen gedrückt.

##### Inhalt der Blasenzellen

Die Blasenzellen ähneln strukturell sehr stark den Adipozyten (Fettspeicherzellen) der Säugetiere. Die Ölrotfärbung (Frischmaterial) und die Osmierung (fixierte Proben) von Tunikamaterial zeigte jedoch, dass es sich bei den in der Vakuole befindlichen Substanzen nicht um Lipidstoffe handelt. Mit SCHIFF'schem Reagenz, Alcianblau, Ölrot, Osmiumtetroxid, Eosin oder in der PAS–Reaktion ließ sich die Vakuole der Blasenzellen nicht anfärben, der dünne Cytoplasmasaum war im LM ohnehin kaum erkennbar.



**Tafel 26****Blasenzellen**

1. LM-Aufnahme (DIC) eines Paraffinschnittes durch eine Blasen-Zelle. Peripher ist der Zellkern zu erkennen (Rahmen). Färbung: Häma-laun nach MAYER.
2. 3D-Aufnahme (Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop) von Tunikagewebe. Das Hauptvolumen der Tunika wird von Blasen-Zellen gebildet. Anregungswellenlänge: 488 nm. (Bitte Rot-Blau-Brille verwenden; s. letzte Seite)
3. EDX-Spektrum einer voll hydratisierten Blasen-Zelle im Kryo-REM. Die starken O- und S-Signale deuten darauf hin, daß es sich bei der in den Blasen-Zellen nachgewiesene Säure um Schwefelsäure handelt.
4. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Blasen-Zellen nach Anfärbung mit dem säuresensitiven Farbstoff Lyso Sensor Blue DNT-167. Die Vakuolen der Blasen-Zellen fluoreszieren (neben lysosomalen Bereichen anderer Tunikazellen) leuchtend blau (Sterne).

Aufgrund der Häufigkeit der Blaszellen in der Tunika und des sauren pH-Wertes der aus der Tunika gewonnenen Flüssigkeit wurde vermutet, dass der Inhalt der Vakuole der Blaszellen stark sauer ist. Dies konnte durch die Anfärbung vitaler Gewebe mit LysoSensor Blue DND-167 und anschließende Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop bestätigt werden: Die Vakuolen fluoreszieren intensiv blau (Tafel 26, Abb. 4). Mit Hilfe der Elementanalyse (EDX) im Kryo-REM an voll hydratisierten Proben wurde gezeigt, daß die Vakuolen der Blaszellen große Mengen an Sauerstoff und Schwefel enthalten (Tafel 26, Abb. 3). Die Vakuolen der Blaszellen zeigen keine Autofluoreszenz. Fluoreszenz des schmalen Plasmasaums bei Anregung durch Grünlicht wurde beobachtet, diese war aber wegen der sehr geringen Plasmamenge nur schwach ausgeprägt. Der flach im Cytoplasma liegende, linsenförmige Zellkern kann mit Hämalaun blau gefärbt und dadurch gut sichtbar gemacht werden (s. Tafel 26, Abb. 1).

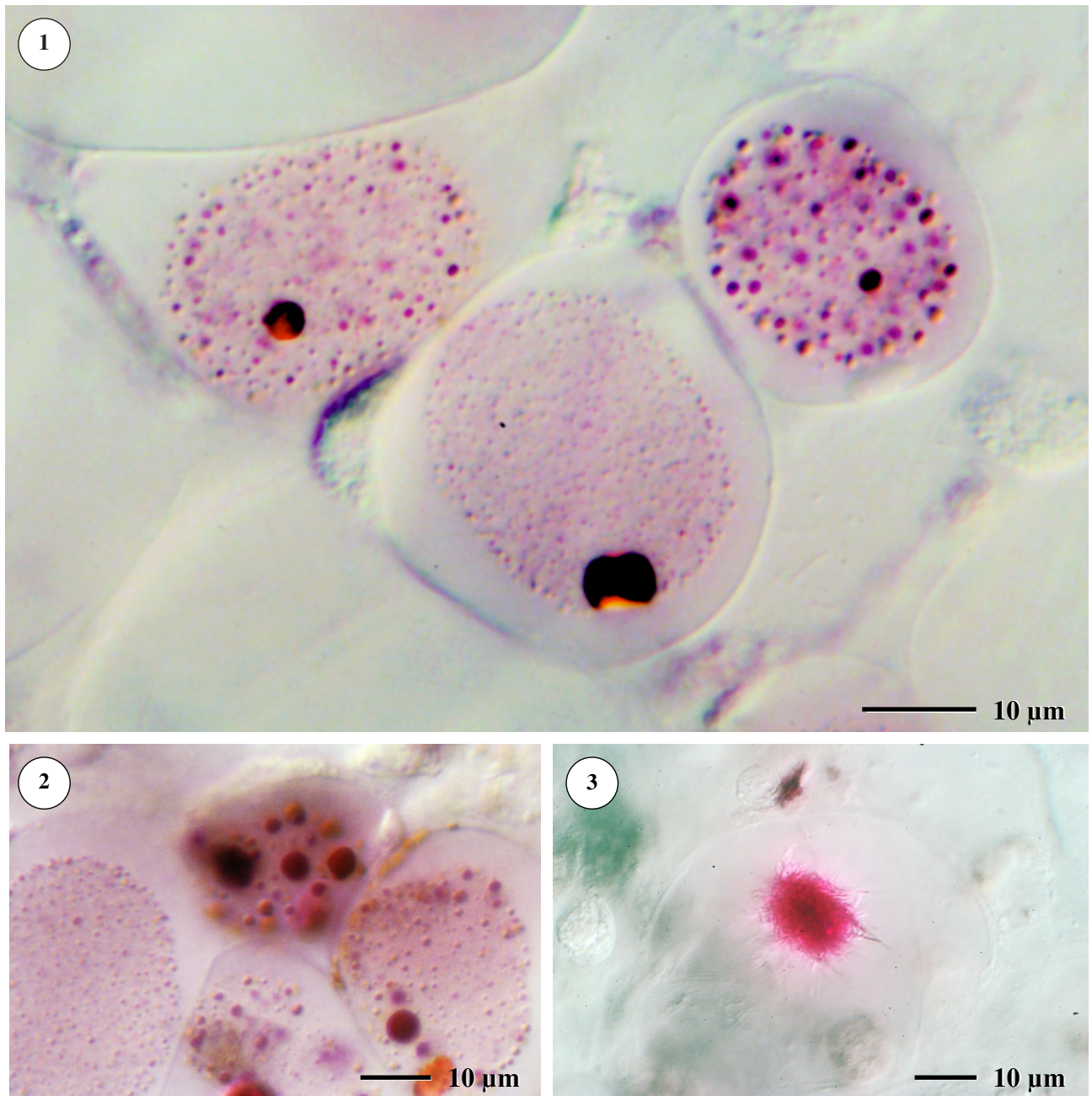
### 3.3.2 Pigmentzellen in violetten Kolonien

Pigmentzellen in der Tunika von violetten *C. dellechiaiei*-Kolonien haben einen mittleren Durchmesser von 30 µm, gelegentlich können kleinere Pigmentzellen (Durchmesser ca. 15 µm) beobachtet werden. Auch sie sind, wie die Blaszellen, gekennzeichnet durch eine große, kugelförmige bis polygonale „Vakuole“. Die Vakuole der Pigmentzellen enthält Pigmentkörner. Cytoplasma und Zellkern der Pigmentzelle werden auf einen schmalen peripheren Bereich zusammengedrängt und sind im ungefärbten Präparat lichtmikroskopisch kaum sichtbar. Der Zellkern ist linsenförmig und etwa 5 x 3 µm groß.

#### Pigmentzellen im Lebendmaterial (Lichtmikroskopie)

In violetten Kolonien liegen in der Vakuole der Pigmentzellen zahlreiche, im Frischzustand kräftig rotviolette, kugelförmige Pigmentkörner (Tafel 27). Die Körner bilden einen Pigmentballen von ovoider bis kugelförmiger Form, der etwa 50–70 % des Vakuolenvolumens einnimmt. Die einzelnen Pigmentkörner zeigen im Lichtmikroskop auffallenderweise keine BROWN'sche Molekularbewegung. Die Bereiche zwischen den Pigmentkörnern sind farblos oder zart rosa (Tafel 27, Abb. 1 und 2).

Lichtmikroskopisch können zwei Bautypen von Pigmentzellen in violetten Kolonien von *C. dellechiaiei* unterschieden werden: Die Mehrzahl der violetten Pigmentzellen (= Grundtyp, Tafel 27, Abb. 1) enthält zwei Größenklassen von Pigmentkörnern: zahlreiche, relativ kleine Körner (Ø 0,5–1 µm), und 1 bis 3 große Körner (Ø 4–5 µm). Die großen Körner liegen meist im Randbereich des Pigmentballens, während im Inneren des Ballens kleinere Körner vorherrschen (Tafel 30, Abb. 1). In manchen Pigmentzellen treten dagegen viele verschieden große Pigmentkörner (Durchmesser 0,3–5 µm) auf; deutliche Größenklassen lassen sich nicht unterscheiden. Der zweite Pigmentzellen-Typ (Tafel 27, Abb. 2) ist jedoch bei violetten Kolonien von *C. dellechiaiei* die Ausnahme, häufig haben diese Zellen einen geringeren Durchmesser (15–20 µm) als Grundtyp-Pigmentzellen.

**Tafel 27**

Pigmentzellen in violetten Kolonien (LM an Frischmaterial, DIC)

1. Pigmentzellen-Grundtyp. Die Zellen besitzen eine große Vakuole mit einem Pigmentballen, der von einem transparenten Zwischenraum umgeben ist.
2. Pigmentzelle einer violetten Kolonie mit großen Körnern. Durch den großen Durchmesser erscheinen die Pigmentkörner orangerot (größere Schichtdicke).
3. Pigmentzelle mit faserigen Pigmentaggregaten.

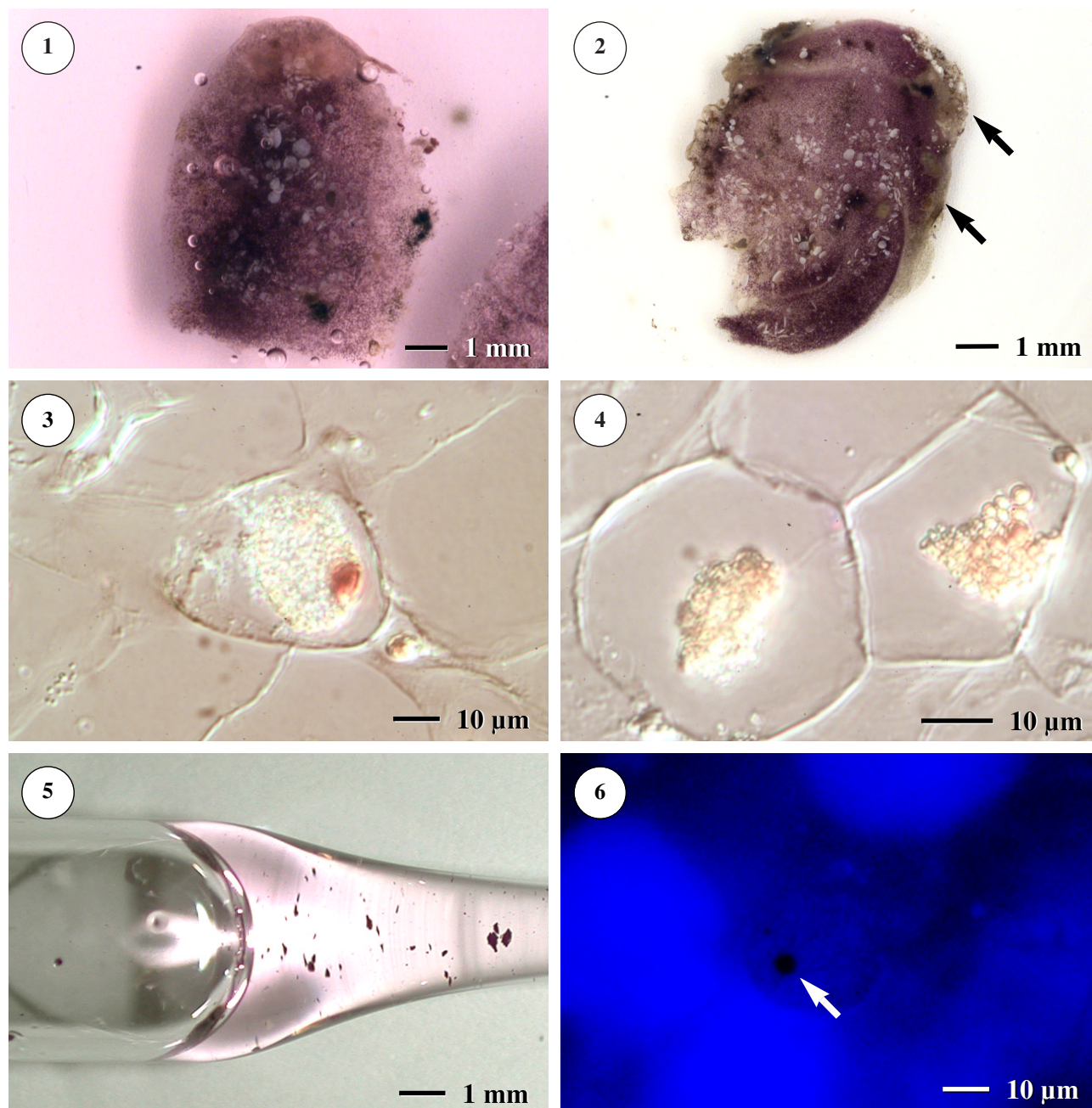


Der Pigmentballen nimmt nur einen Teil des Vakuolenvolumens ein, meist liegt er zentral in der Vakuole oder leicht zu einer Seite hin verschoben. An den übrigen Seiten ist ein transparenter, farbloser Zwischenraum zwischen Tonoplast und Pigmentballen erkennbar. Kontakte zwischen Tonoplast und Pigmentballen sind lichtmikroskopisch nicht zu erkennen. Gelegentlich lassen sich in Handschnitten von Frischmaterial kristallartige, faserige Pigmentansammlungen in Pigmentzellen beobachten (Tafel 27, Abb. 3).

### **Pigmentzellen in fixierten Proben**

Bei chemisch fixierten (auch bei natürlicherweise abgestorbenen Kolonien) ändert sich die charakteristische rotviolette Farbe der Pigmentkörner: Im LM erscheinen sie nun gelb (Tafel 28, Abb. 2, 3 und 4) Säurebehandlung von fixiertem Gewebe ursprünglich violetter Kolonien ergab, daß sich die bei der Fixierung eingetretene Gelbfärbung der Pigmentkörner auch wieder rückgängig machen lässt: bei Ansäuerung von Paraffinschnitten auf pH 1 werden die Pigmentzellen wieder rotviolett. Diese Indikatorfunktion der Pigmentzellen stimmt mit dem Verhalten isolierter Pyridoacridinalkaloide aus violetten Kolonien von *C. dellechiaiei* überein. Die bei sehr niedrigen pH-Werten (bis etwa pH 2–3) roten Pigmente Shermilamin B und Kuanoniamin färben sich in schwächer sauren, neutralen und alkalischen Lösungen gelb (CIUFOLINI et al. 1995). In dicker Schicht erscheinen die isolierten Pigmente orangerot (STEFFAN, persönliche Mitteilung; s. auch Tafel 3 der Einleitung). Dies kann auch an großen Pigmentkörnern in frischen Handschnitten beobachtet werden (Tafel 27, Abb. 2).

Die Fixierung und Entwässerung bewirkt zusätzlich zu der Farbänderung auch strukturelle Veränderungen innerhalb der Pigmentzellen. Bei fixierten Pigmentzellen kann der transparente Zwischenraum zwischen Pigmentballen und Tonoplast stark vergrößert sein. Der Pigmentballen verliert deutlich an Volumen: Im Extremfall füllt in fixierten Zellen der Pigmentballen nur noch weniger als 10 % des Vakuolenvolumens aus. Die Größe der Pigmentkörner verändert sich dabei nicht, aber die Abstände zwischen den einzelnen Körnern verringern sich um maximal 40 %. Durch die Schrumpfung des Ballens wird die dezentrale Lage des Pigmentballens noch verstärkt: er liegt nur noch auf einer sehr kleinen Fläche dem Tonoplasten an. Diese strukturellen Veränderungen sind allerdings auf den Pigmentballen in der Vakuole beschränkt, die Form der ganzen Zellen ändert sich nicht. Wie bei den Blaszellen kommt es kaum zur Schrumpfung der Zellen, die Plasmamembranen liegen der umgebenden Tunikamatrix dicht an. Besonders starke Veränderungen von Pigmentzellen traten vor allem bei den zu Beginn der Arbeit untersuchten Proben auf, da diese häufig noch mit Puffern niedriger Osmolarität (75 mM Cacodylatpuffer) behandelt wurden, sowie bei den mehrmals durch Entwässerungs- und Rehydrierungsreihen geführten Paraffinschnitten. Die strukturellen Veränderungen innerhalb der Pigmentzelle waren – im Gegensatz zur Farbänderung – durch Säurezugabe nicht wieder rückgängig zu machen.

**Tafel 28****Pigmentzellen in violetten Kolonien**

1. Tunikaprobe einer violetten Kolonie von *C. dellechiaiei* in verdünnter Schwefelsäure (pH 1). Die Probe bleibt violett, Pigment löst sich aus dem Gewebe (Stereomikroskopische Aufnahme, Frischmaterial).
2. Tunikaprobe einer violetten Kolonie von *C. dellechiaiei* in Fixierungspuffer (pH 7). Von den Rändern her verfärbt sich die Probe und wird braun (Pfeile). Das Pigment bleibt im Gewebe, da es sich im pH-neutralen Puffer nicht löst.
3. Pigmentzelle (Frischmaterial, LM, DIC) einer braun verfärbten Kolonie. Die Pigmentkörner sind gelb.
4. Pigmentzelle (Paraffinschnitt, LM, DIC). Als Folge von Fixierung und Entwässerung kann gelegentlich eine starke Verkleinerung des Pigmentballens beobachtet werden. Auch hier sind die Pigmentkörner gelb.
5. Makroaufnahme einer Lösung von isoliertem Shermilamin in verdünnter Schwefelsäure. Das Pigment löst sich nur teilweise. Die Färbung der Lösung entspricht der Farbe von Vakuolenflüssigkeit in Pigmentzellen von *C. dellechiaiei*.
6. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Pigmentzelle nach Anfärbung mit dem säuresensitiven Farbstoff Lyso Sensor Blue DND-167. Die Vakuolen der Pigment- und Blasen zellen fluoreszieren blau, die Pigmentkörner selbst fluoreszieren nicht (Pfeil).

### Ultrastruktur der violetten Pigmentzellen

Im REM und TEM wird die Struktur des Pigmentballens deutlich: Die einzelnen Pigmentkörner sind durch ein dreidimensionales, dichtes Netzwerk aus drehrunden Fibrillen verbunden (Tafel 29, Abb. 1; Tafel 30). Die Netzwerkfibrillen haben an manchen Stellen kleinere Verdickungen, der Durchmesser der Fibrillen bleibt jedoch relativ konstant (Werte zwischen 40 und 80 nm; s. Tafel 30, Abb. 4). Die Fibrillen sind aufgrund ihres geringen Durchmessers und vermutlich schwachen Kontrasts im LM nicht erkennbar. Die Zwischenräume zwischen den Fibrillen sind sehr klein (unter 0,5  $\mu\text{m}$ ), jedoch muß beachtet werden, daß die Abstände durch Kontraktion des Pigmentballens bei der Fixierung beeinflusst sein können.

Die Fibrillen des Netzwerks erscheinen im TEM bei hoher Vergrößerung nicht homogen, sondern bestehen aus mäßig kontrastiertem, fein fibrillären Material und vielen stark kontrastierten Granula (Durchmesser der Granula etwa 5 nm; s. Tafel 31, Abb. 4 und Tafel 33, Abb. 4). Im REM erscheint die Oberfläche der Netzwerkfibrillen durch zahlreiche Verdickungen grob gekörnt (Tafel 30, Abb. 4). Größere, pigmentkornartige Verdickungen (Durchmesser über 150 nm) in den Netzwerkfibrillen, wie sie bei grünen Kolonien und Pigmentzellen in violetten Larven häufig sind, konnten im Pigmentzellen-netzwerk violetter Kolonien kaum beobachtet werden. Netzwerk und Körner sind stets deutlich voneinander abgesetzt, Pigmentkörner unter 200 nm Durchmesser sind selten. Das faserige Netzwerk im Pigmentballen ist auch im Kryo-REM erkennbar (Tafel 29, Abb. 2; Tafel 30, Abb. 3).

Die kugelförmigen Pigmentkörner sind, wie an Ultradünnschnitten (Schnittdicke 50 nm) im TEM gezeigt werden konnte, zweischichtig aufgebaut: Ein relativ homogener, kontrastierter Kernbereich wird von einer Hülle aus dunkler erscheinendem, granulärem Material umgeben (Tafel 31, Abb. 3). Die Hüllschicht ist ähnlich aufgebaut wie die Netzwerkfibrillen: Im TEM läßt sich eine homogene bis fibrilläre, mäßig elektronendichte Grundsubstanz erkennen, in die zahlreiche sehr elektronendichte Granula eingebettet sind (Tafel 31, Abb. 4). Die Granula der Hüllschicht sind, wie die Granula der Netzwerkfibrillen, etwa 5 nm groß. Die gesamte Hüllschicht ist etwa 30–60 nm dick (Tafel 32, Abb. 1). Da die Stärke der Hüllschicht nicht an allen Stellen gleich ist, haben die Pigmentkörner eine leicht gewellt erscheinende Oberfläche (Tafel 31, Abb. 3). Im TEM können in Pigmentkörnern ringförmige Querschnitte mit geringem Durchmesser und homogenem, mäßig kontrastiertem Inhalt beobachtet werden (Tafel 31, Abb. 3 und Tafel 32, Abb. 1). Sie treten nur in der granulären Randschicht der Pigmentkörner auf. In vielen Pigmentzellen finden sich neben den kugelförmigen Einzelkörnern auch häufig größere, unregelmäßig geformte Pigmentkörner (Tafel 31, Abb. 2).

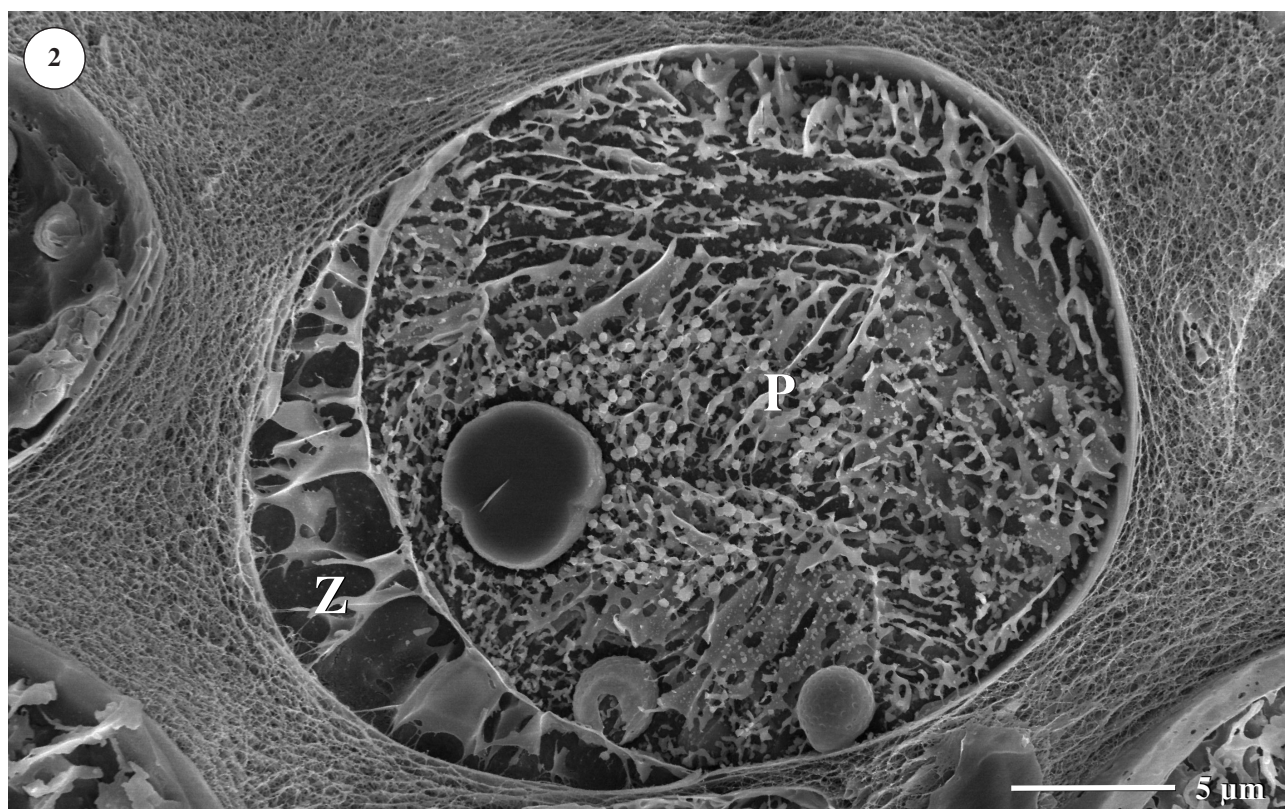
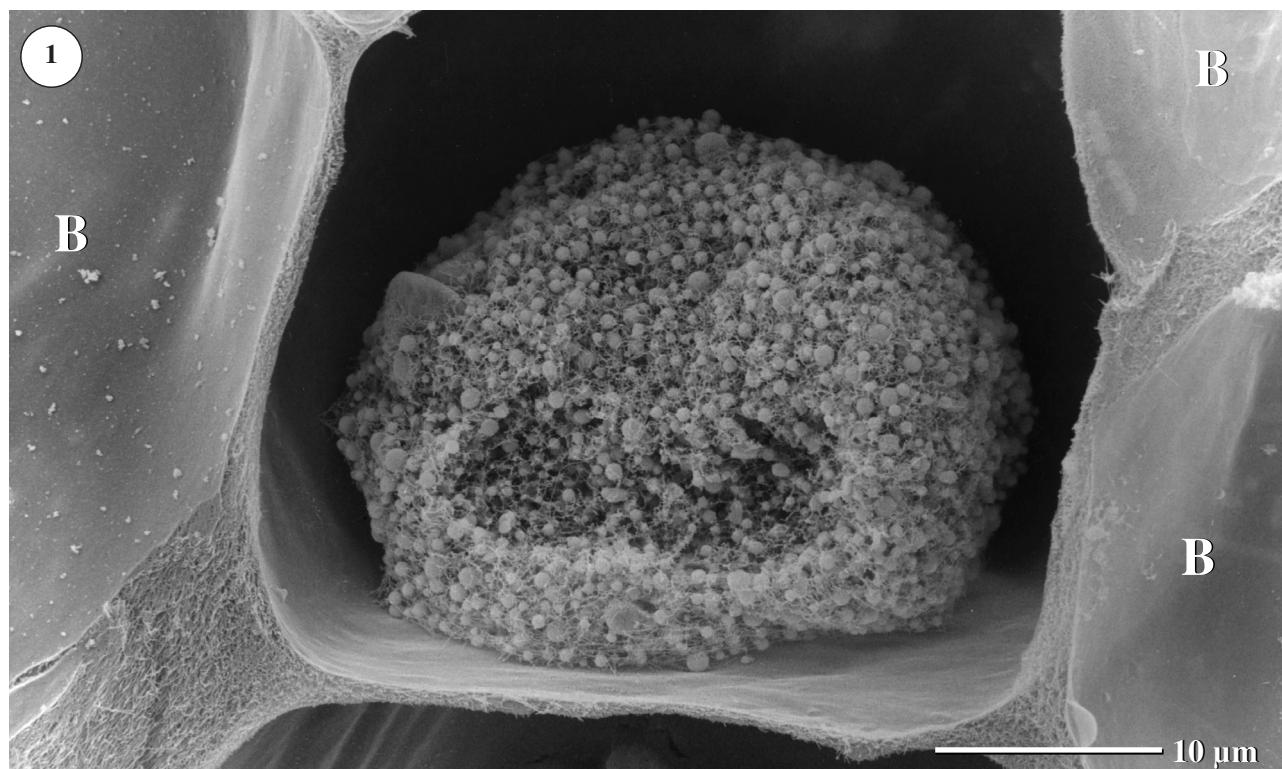
Aufgrund der starken Kontrastierung der Pigmentkörner insgesamt ist nicht eindeutig erkennbar, ob die einzelnen Körner von einer Elementarmembran umgeben sind. An Fusionsstellen von Pigmentkörnern sind jedoch gelegentlich membranähnlich („dunkel–hell–dunkel“) kontrastierte Begrenzungen sichtbar, die es ermöglichen, die beiden Körner noch voneinander zu unterscheiden, bevor sie ineinander übergehen (Tafel 32, Abb. 1). Ebenso erscheinen die winzigen, in der Oberflächenschicht größerer Körner nachgewiesenen Körnchenquerschnitte von einer feinen helleren Linie umgeben (Tafel 32, Abb. 1).

Es ist daher wahrscheinlich, daß Pigmentkörner von einer Membran begrenzt werden, die unterhalb der granulären Randschicht der Pigmentkörner lokalisiert ist.

Jedes Pigmentkorn hat mehrere Kontaktstellen mit dem Fibrillennetzwerk (= oligojunktional, Tafel 32, Abb. 1; Tafel 30, Abb. 4). Die Netzwerkfibrillen sind vor dem Eintritt in das Pigmentkorn nicht verdickt, sondern münden mit gleichbleibendem Durchmesser in das wesentlich größere Pigmentkorn ein bzw. laufen an der Oberfläche des Pigmentkorns entlang (Tafel 30, Abb. 4; Tafel 32, Abb. 1). Im TEM an Ultradünnschnitten wird sichtbar, daß die Netzwerkfibrillen nicht in das homogene Zentrum des Pigmentkorns hineinführen, sondern mit der granulären äußeren Schicht des Pigmentkorns verschmelzen (Tafel 32, Abb. 1). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Körnerrandschicht und Netzwerkfibrillen sind nach dem Eintritt in das Pigmentkorn die Netzwerkfibrillen nicht mehr von der ebenso elektronendichten und granulären Randschicht des Korns zu unterscheiden (Tafel 32, Abb. 1).

An der Innenseite des Tonoplasten der Pigmentzellen ist im TEM eine durchgehend aufgelagerte, sehr elektronendichte Schicht zu erkennen, die strukturell den Netzwerkfibrillen bzw. der Körnerrandschicht der Pigmentzellen entspricht (Tafel 31, Abb. 2, Tafel 32, Abb. 2 und 3). Wie diese ist die aufgelagerte Schicht nicht gleichmäßig dick, ihre Stärke variiert zwischen 40 und 80 nm. Sie besteht aus einer homogenen bis fibrillären, mäßig kontrastierten Grundsubstanz und sehr kleinen elektronendichten Granula (Tafel 32, Abb. 2). An manchen Stellen sind Verbindungen zwischen Netzwerkfibrillen und der aufgelagerten Schicht am Tonoplasten erkennbar (Tafel 32, Abb. 2). Im REM ist die Auflagerung am Tonoplasten nicht vom Tonoplasten selbst zu unterscheiden, aber auch bei REM-Proben sind Verbindungen zwischen dem Tonoplasten und dem Pigmentnetzwerk erkennbar. Der gesamte Pigmentballen, der von Fibrillennetzwerk und Pigmentkörnern gebildet wird, hat meist nur an einer Seite der Vakuole Kontakt mit der Auflagerung auf dem Tonoplasten (Tafel 29; Abb. 1, Tafel 31, Abb. 1). Das Volumen des Cytoplasmas der Pigmentzellen ist – im Verhältnis zum Gesamtvolumen der Zellen – sehr klein (Tafel 32, Abb. 3). Neben Vakuole und Zellkern können gelegentlich Mitochondrien, kleine Membranabschnitte des Endoplasmatischen Reticulums, Vesikel, Ribosomen und Dictyosomen in den Pigmentzellen beobachtet werden. Die äußere Kernmembran weist nur wenige Falten bzw. Zisternen auf, sondern liegt der inneren Kernmembran glatt an (Tafel 33, Abb. 1). Im Cytoplasma der Pigmentzellen liegen häufig zahlreiche elektronentransparente Vesikel von variabler Größe ( $\varnothing$  50 nm–1,5  $\mu$ m; Tafel 33, Abb. 1). Gelegentlich findet man im Cytoplasma der Pigmentzellen ein membranumgrenztes Kompartiment, das gestapelte und Röhrchen bildende Membranen und homogene, mäßig elektronendichte Körner enthält (Tafel 33, Abb. 2, 3). Der Durchmesser dieses Organells beträgt etwa 1–2  $\mu$ m (Tafel 33, Abb. 2 und 3).

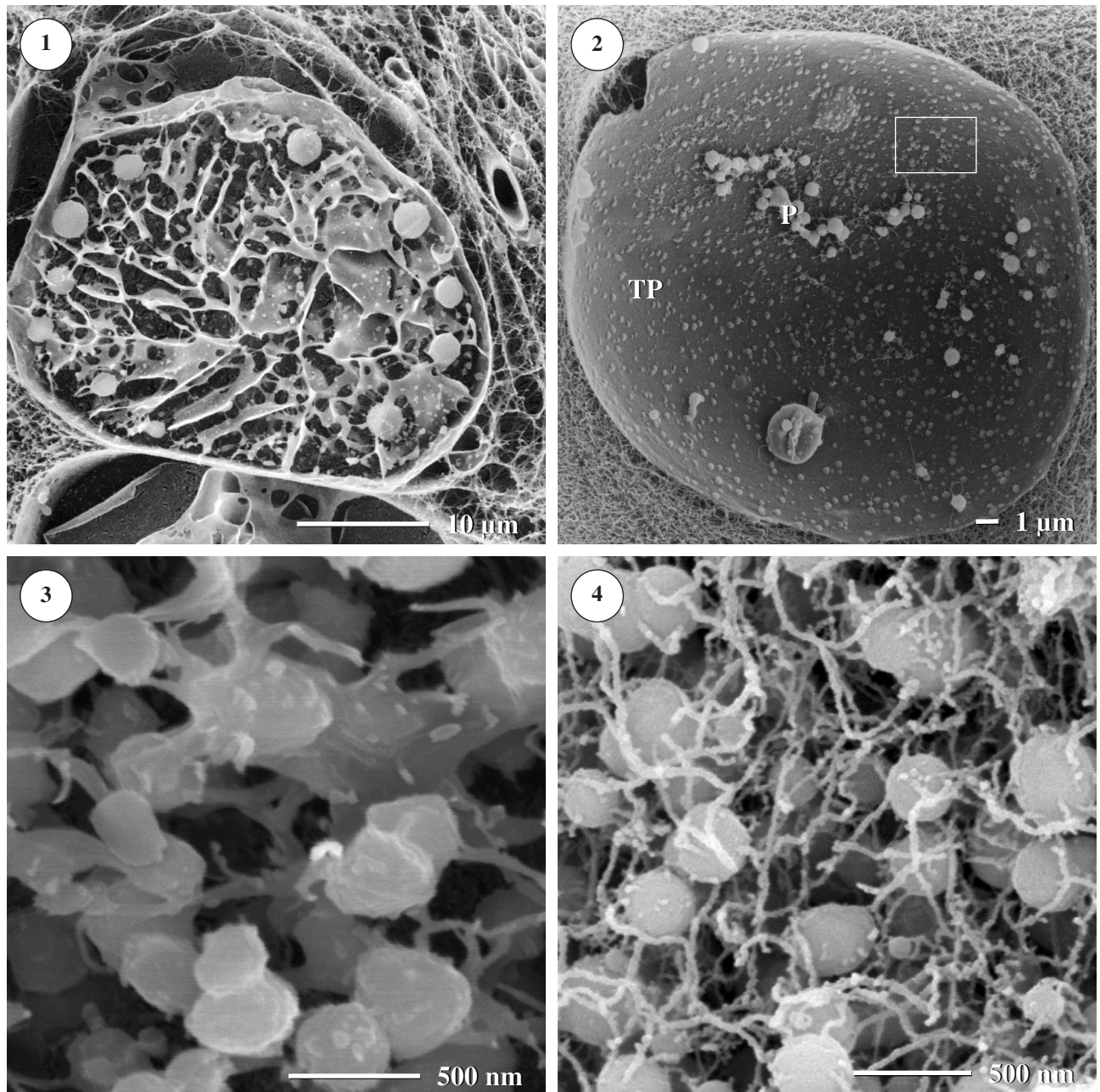


**Tafel 29**

Pigmentzellen in violetten Kolonien

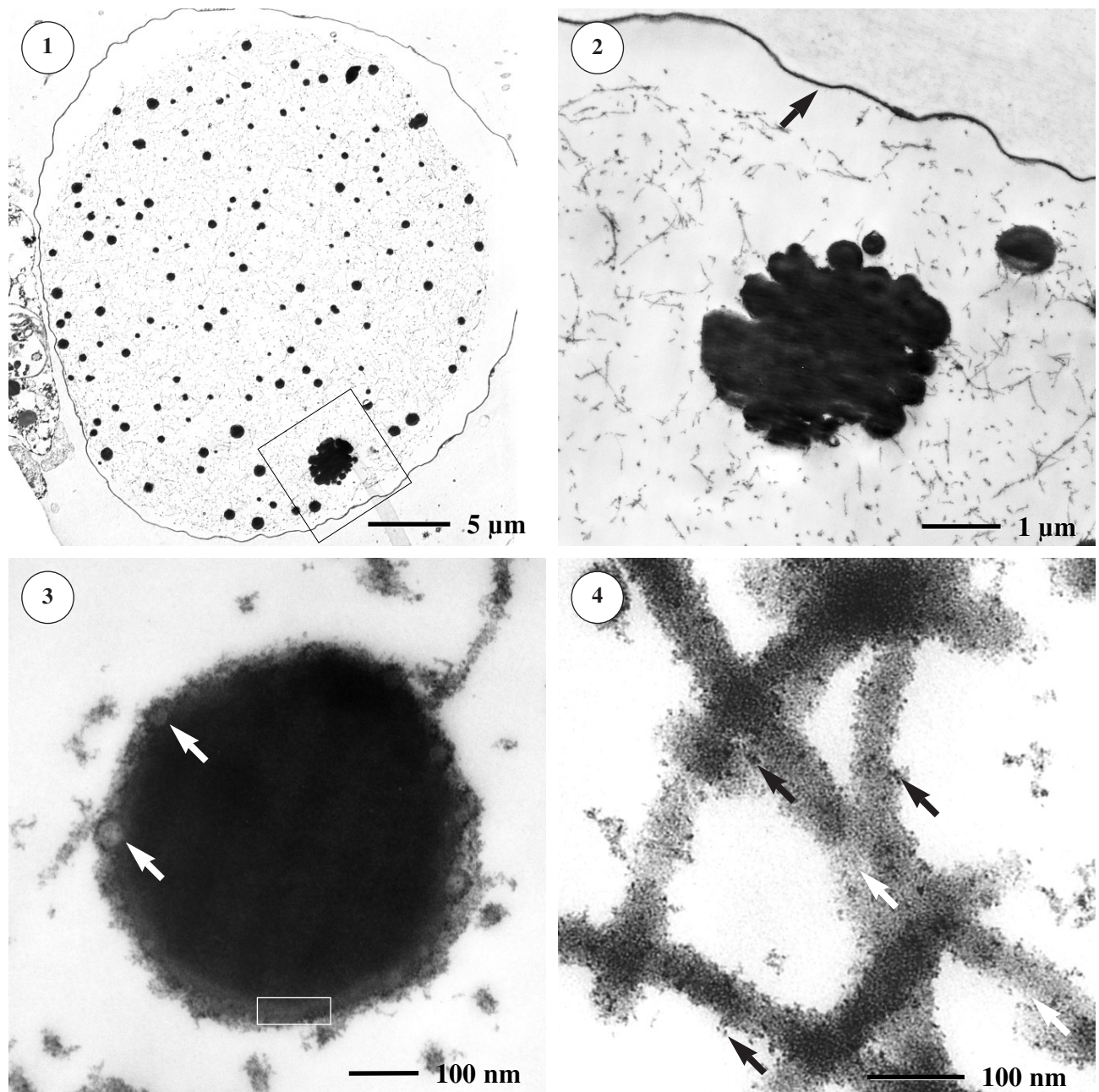
1. REM-Aufnahme eines Gefrierbruchs (Technik nach TANAKA) durch eine Pigmentzelle. In der Vakuole der Zelle liegt ein »Pigmentballen« aus Netzwerkfibrillen und Pigmentkörnern. Die Pigmentzelle wird von Blaszellen (B) flankiert.
2. Kryo-REM-Aufnahme einer Pigmentzelle (P). In der Vakuole bleibt bei der Sublimation Salz zurück, das lamellenartige Strukturen bildet und damit die Abbildung der Netzwerkfibrillen erschwert. Die unmittelbar an der Pigmentzelle anliegende Zelle (Z) gehört wahrscheinlich zum filopodalen Typ.



**Tafel 30**

Pigmentzellen in violetten Kolonien (Rasterelektronenmikroskopie)

1. Kryo-REM-Aufnahme einer Pigmentzelle. Größere Pigmentkörner sind peripher, kleinere zentral im Pigmentballen lokalisiert. Der Zwischenraum zwischen Pigmentballen und Tonoplast ist sehr klein. Zwischen den Pigmentkörnern ist das fibrilläre Netzwerk aufgrund zurückbleibender Salze nur schwer zu erkennen.
2. REM-Aufnahme (Gefrierbruch nach TANAKA) des Tonoplasten einer Pigmentzelle. Am Tonoplasten sind zahlreiche Aufwölbungen zu erkennen (Rahmen). Der Großteil des Pigmentballens ist herausgebrochen, nur wenige Pigmentkörner (P) haften noch am Tonoplasten (TP). An der Innenseite des Tonoplasten sind zahlreiche helle Stellen erkennbar.
3. Kryo-REM-Aufnahme eines Pigmentballens. Aufgrund nach der Sublimation zurückbleibender Salze (lamellenartige Strukturen) erscheinen die Fibrillen und Pigmentkörner dicker als in konventionell fixierten Proben.
4. REM-Aufnahme (Gefrierbruch nach TANAKA) eines Pigmentballens. Die kugelförmigen Pigmentkörner sind durch Netzwerkfibrillen verbunden.

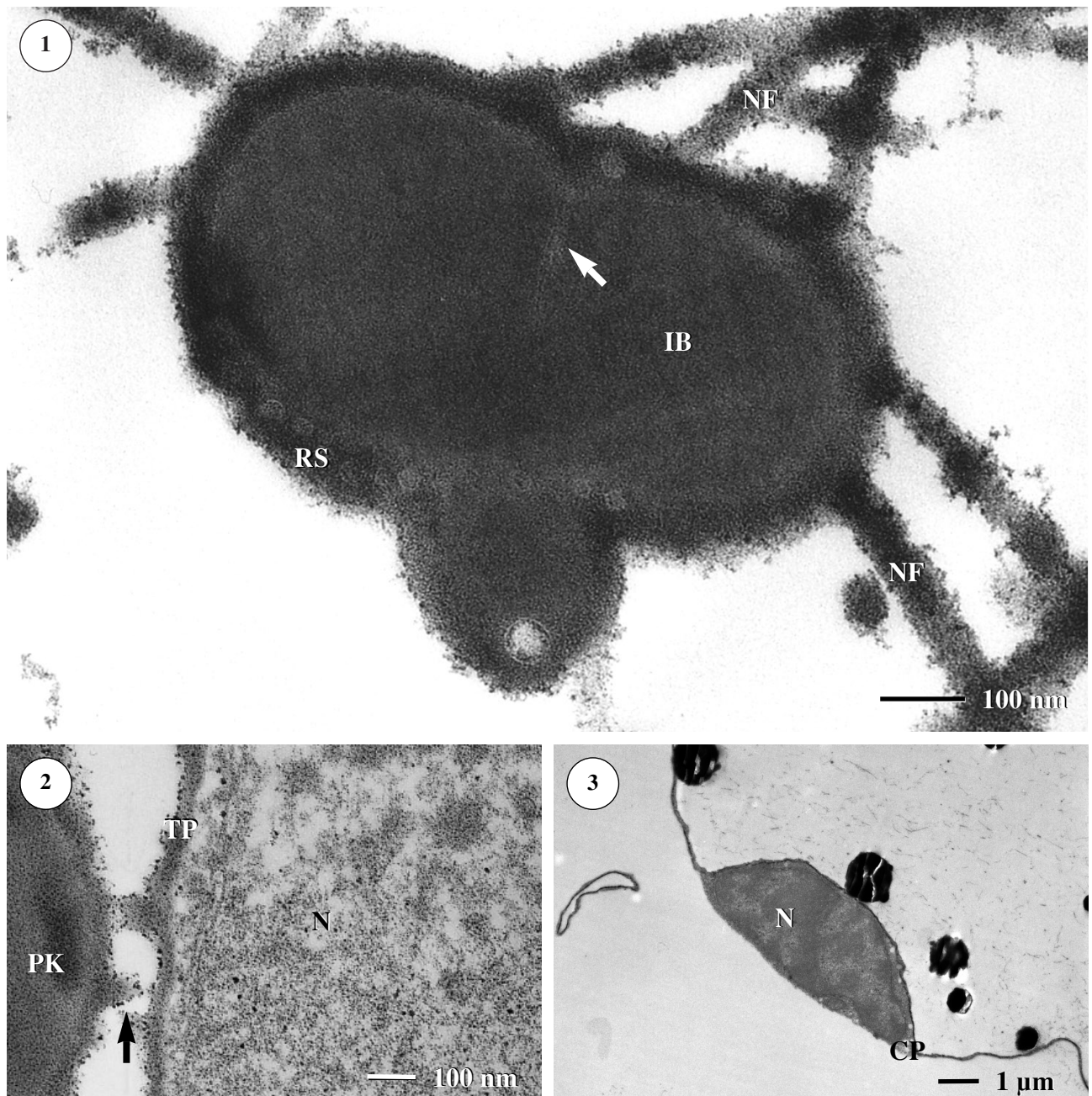


### Tafel 31

#### Pigmentzellen in violetten Kolonien (TEM)

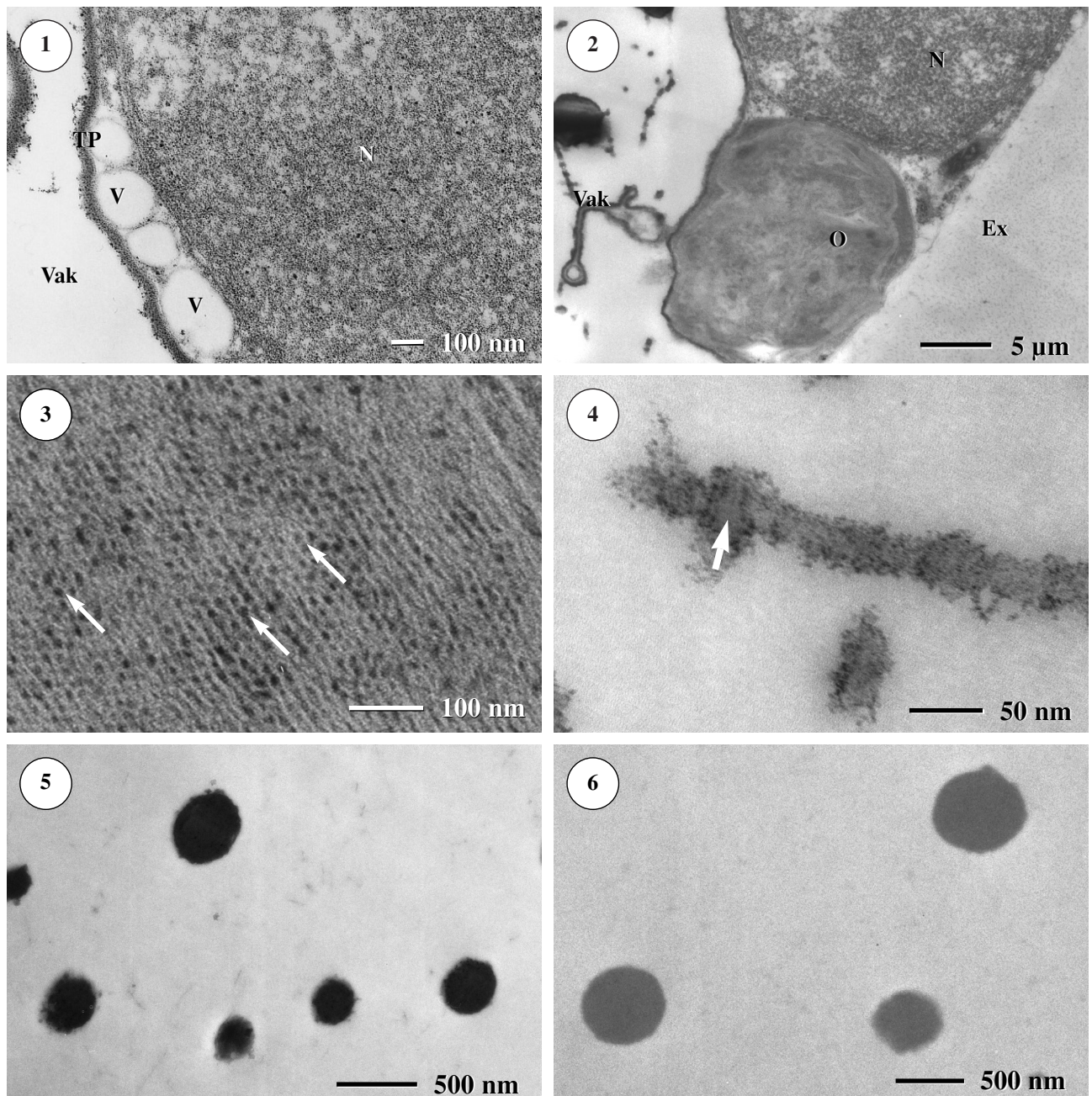
1. Übersichtsaufnahme einer Pigmentzelle im Ultradünnschnitt. Die Zelle wird von der großen Vakuole fast vollständig ausgefüllt. In der Vakuole liegen zahlreiche stark kontrastierte Pigmentkörner. Der Rahmen zeigt die Lage der Detailaufnahme (s. Abb. 2).
2. Detailaufnahme der Zelle aus Abb. 1 (s. Rahmen in Abb. 1). Häufig enthalten Pigmentzellen große Pigmentkörner, die offensichtlich durch Fusion mehrerer kleiner Körner entstanden sind. Der Tonoplast besitzt charakteristischerweise eine durchgehende elektronendichte Auflagerung (Pfeil).
3. Pigmentkörner sind zweischichtig strukturiert: Der homogene, stark kontrastierte Innenbereich ist von einer Randschicht aus feingranulärem Material (Rahmen) umgeben. Im Randbereich des Kornes sind vesikuläre Strukturen erkennbar (Pfeile).
4. Detailaufnahme der Netzwerkfibrillen. Die Fibrillen sind aus einer homogenen, schwach kontrastierten Grundsubstanz (weißer Pfeil) und zahlreichen elektronendichten Granula (schwarze Pfeile) aufgebaut.



**Tafel 32****Pigmentzellen in violetten Kolonien (TEM)**

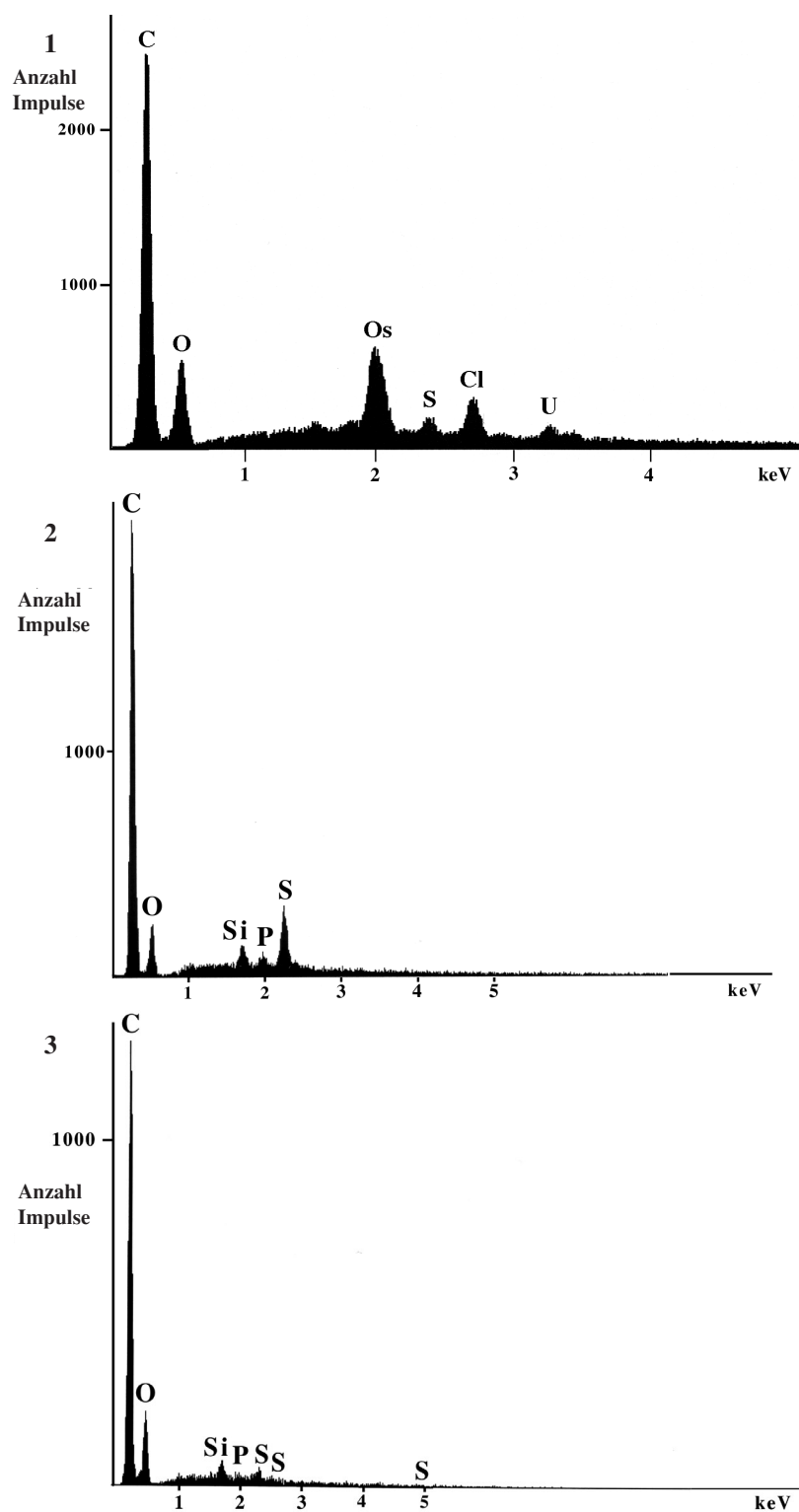
1. TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch fusionierende Pigmentkörner. Randschicht (RS) und Innenbereich (IB) der Körner sind deutlich voneinander abgesetzt. Die Netzwerkfibrillen (NF) münden in die Randschicht des Pigmentkorns. Zwischen den beiden größeren Körnern sind membranähnliche, hellere Strukturen zu erkennen (Pfeil).
2. TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch eine Pigmentzelle. Gelegentlich sind Verbindungen zwischen der Auflagerung am Tonoplasten (TP) und dem Pigmentnetzwerk zu erkennen (Pfeil). Der cytoplasmatische Raum wird fast vollständig vom Zellkern (N) ausgefüllt. (PK = Pigmentkorn).
3. TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch eine Pigmentzelle. Das Cytoplasma (CP) ist auf einen schmalen Bereich um die Vakuole herum beschränkt, der nur im Bereich des Zellkerns (N) etwas erweitert ist.



**Tafel 33**

Pigmentzellen in violetten Kolonien (TEM)

1. Vesikel (V) im Cytoplasma einer Pigmentzelle. N= Nucleus, TP = Tonoplast, Vak = Vakuole.
2. Organell (O) mit Röhrchen bildenden Membranen im Cytoplasma der Pigmentzelle. N= Nukleus, TP = Tonoplast, Vak = Vakuole, Ex = Extrazelluläre Matrix.
3. Detailaufnahme eines »Röhrchenorganells« mit Membranröhrchen (Pfeile).
4. TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch eine Pigmentzelle. Die Probe wurde mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert, aber nur mit Uranylacetat (ohne Bleicitrat) kontrastiert. Die Randschicht der Netzwerkfibrillen ist etwas stärker kontrastiert und mit fein fibrillärem und granulärem Material besetzt, der Innenbereich der Fasern erscheint homogener (Pfeil).
5. TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch eine Pigmentzelle (Pigmentballenbereich). Fixierung Glutaraldehyd (ohne  $\text{OsO}_4$ ), Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat. Die Zentralbereiche der Pigmentkörner sind stark kontrastiert, die Netzwerkfibrillen sind kaum erkennbar.
6. TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch eine Pigmentzelle (Pigmentballenbereich) ohne Schwermetallbehandlung. Nur die Innenbereiche der Pigmentkörner sind erkennbar, jedoch nicht die Randschichten der Pigmentkörner und die Netzwerkfibrillen.

**Tafel 34**

Energiedispersive Röntgenspektren (EDX-Spektren) von violetten Pigmentzellen

1. EDX-Spektrum eines Pigmentkorns, Probe osmium- und uranbehandelt. Pigmentkörner binden Osmium und Uran.
2. EDX-Spektrum eines Pigmentkorns, Probe nicht osmiumfixiert. In unbehandelten Pigmentkörnern wurde (neben Kohlenstoff und Sauerstoff) Schwefel und Phosphor nachgewiesen. Der Silizium-Peak stammt vom Glasobjektträger, auf den der Schnitt aufmontiert wurde.
3. EDX-Spektrum des Fasernetzwerks einer Pigmentzelle, Probe nicht osmiumfixiert. Auch die Netzwerkfibrillen enthalten Schwefel und Phosphor (Entstehung des Si-Peaks wie bei Abb. 2).



### Inhalt der violetten Pigmentzellen

Mit dem säuresensitiven Fluoreszenzfarbstoff Lyso Sensor Blue DND–167 färbten sich die Vakuolen der Pigmentzellen schwach blau, die Pigmentkörner selbst fluoreszierten jedoch nicht, daher war auch die Fluoreszenz des farblosen Vakuoleninhalts nur bei starker Anregung (100 W–Quecksilberdampflampe) zu erkennen (Tafel 28, Abb. 6).

Mit SCHIFF'schem Reagenz, Alcianblau, Ölrot, Eosin oder in der PAS–Reaktion ließ sich die Vakuole der Pigmentzellen nicht anfärben, der dünne Cytoplasmasaum war im LM kaum erkennbar. Autofluoreszenz von Pigmentzellen wurde (mit Ausnahme einer sehr schwachen Rotfluoreszenz des Cytoplasmasaums bei starker Anregung mit Grünlicht) nicht beobachtet. Der Zellkern konnte mit Hämalaun blau gefärbt werden. Die Pigmentkörner reagierten nicht mit SCHIFF'schem Reagenz, Alcianblau, Ölrot, Eosin oder in der PAS–Reaktion. Deutlich war hingegen die Reaktion mit Osmiumtetroxid: hierbei wurden die Pigmentkörner schwarz gefärbt. Das Netzwerk zwischen den Pigmentkörnern war auch nach Behandlung mit Färbereagenzien im LM nicht erkennbar. Mit Hilfe der EDX–Analyse im REM konnte in den Pigmentkörnern und in den Netzwerkfibrillen Schwefel nachgewiesen werden (Tafel 34, Abb. 1–3).

Versuche mit unterschiedlichen Kontrastierungsmitteln zeigten, dass der Hauptkontrast der Netzwerkfibrillen im TEM durch eine Reaktion mit Osmiumtetroxid zustande kommt (Tafel 33, Abb. 5). Mit Uranylacetat und/oder Bleicitrat sind die Netzwerkfibrillen nur schwach kontrastierbar (Tafel 32, Abb. 5). Kontrastierung mit Osmiumtetroxid und Uranylacetat ohne Nachkontrastierung mit Bleicitrat führte aber zu einer differenzierten Darstellung des Faseraufbaus: Das Innere der Fibrillen erschien homogen und elektronentransparent, die Randschichten granulär und etwas elektronendichter (Tafel 33, Abb. 4).

Die Pigmentkörner reagieren – zumindest im homogenen Innenbereich – schwach mit Bleicitrat, etwas stärker mit Uranylacetat und stark mit Osmiumtetroxid (Tabelle 7). Bei Behandlung mit mehreren dieser Schwermetallsalze kommt es zu einer Addition der Kontrastwirkung, so daß konventionell (also mit allen drei Kontrastierungsmitteln) kontrastierte Pigmentkörner tiefschwarz (= elektronendicht) erscheinen (Tafel 31, Abb. 2; Tafel 32, Abb. 3). Parallel dazu zeigen im REM aufgenommene EDX–Spektren von Pigmentzellen in Kunstharzschnitten (TEM–Standardfixierung mit Osmiumtetroxid und Uranylacetat) eine starke Anwesenheit von Osmium, aber auch von Uran in Pigmentkörnern (Tafel 34, Abb. 1).

**Tabelle 7**

*Kontrastierung der Pigmentzellenelemente*

	Kontrast mit Bleicitrat	Kontrast mit Uranylacetat	Kontrast mit Osmiumtetroxid	ohne Kontrastierungsmittel
<b>Netzwerkfibrillen</b>	+/-	+/-	++	–
<b>Pigmentkörner</b>	++	++	+++	+

### 3.3.3 Pigmentzellen in grünen Kolonien

#### Lichtmikroskopisches Erscheinungsbild

Pigmentzellen in grünen Kolonien von *C. dellechiaiei* besitzen ebenfalls eine große, kugelförmige bis polygonale Vakuole, einen schmalen Cytoplasmasaum und einen linsenförmigen Kern ( $\varnothing$  ca. 5  $\mu\text{m}$ ; Tafel 35, Abb. 1 und 2). Die Größe der Zellen entspricht mit etwa 20–30  $\mu\text{m}$  der Größe der Pigmentzellen violetter Kolonien. Die Anzahl der lichtmikroskopisch in der Vakuole grüner Pigmentzellen sichtbaren Pigmentkörner ist meist wesentlich geringer als in den Pigmentzellen violetter Kolonien (Tafel 35, Abb. 1 und 2). Zum einen liegt dies daran, daß die meisten grünen Pigmentzellen viel weniger Körner enthalten als die violetten Pigmentzellen. Zum anderen sind die Pigmentkörner in grünen Pigmentzellen häufig deutlich kleiner (vgl. Tafel 35, Abb. 3 und 4) und bieten aufgrund ihrer hellen, grünlichen Farbe einen schwächeren Kontrast als die leuchtend rotvioletten Pigmentkörner. Grüne Pigmentkörner mit einem Durchmesser unter 0,5  $\mu\text{m}$  sind wahrscheinlich im LM nicht mehr eindeutig zu erkennen. Im Frischzustand sind die Pigmentkörner grünlich und ändern ihre Farbe bei der Fixierung rasch zu hellem Gelb. Die chemische Struktur des grünen Pigments ist bisher unbekannt, möglicherweise handelt es sich aber, wie bei den Pigmenten der violetten Kolonien, um ein Pyridoacridinalkaloid (STEFFAN, persönliche Mitteilung).

Die Pigmentkörner zeigen –wie die Pigmentkörner in violetten Kolonien– keine BROWN'sche Molekularbewegung. Netzwerkfibrillen in der Vakuole der Pigmentzellen sind auch in grünen Kolonien im LM nicht sichtbar. Die Bereiche zwischen den Pigmentkörnern erscheinen im LM häufig graugrün (Tafel 35, Abb. 2), sind aber stets transparent.

#### Ultrastruktur der grünen Pigmentzellen

Auch bei grünen Pigmentzellen sind sowohl kugelförmige Pigmentkörner, als auch Netzwerkfibrillen in der Vakuole der Pigmentzellen vorhanden (Tafel 35, Abb. 3; Tafel 36). Allerdings enthalten grüne Pigmentzellen meist weniger Pigmentkörner, dadurch sind die Abstände zwischen den einzelnen Körnern häufig recht groß, das Fibrillennetzwerk ist lockerer (Tafel 36, Abb. 1). Die Größe der Pigmentkörner liegt zwischen 0,1 und 3  $\mu\text{m}$ ; im Durchschnitt sind die grünen Pigmentkörner deutlich kleiner als die violetten Körner. In grünen Pigmentzellen wurde die Ausbildung einzelner „Großkörner“ nicht regelmäßig beobachtet, meist sind alle Pigmentkörner einer Zelle etwa gleich groß (Tafeln 36 und 37). In vielen Zellen können Verschmelzungsstadien mehrerer kleiner Pigmentkörner nachgewiesen werden (Tafel 36, Abb. 4).

Die Netzwerkfibrillen grüner Pigmentzellen sind drehrund und häufig dicker als Netzwerkfibrillen in violetten Pigmentzellen. Sie haben aufgrund zahlreicher Verdickungen und Knötchen einen stark variierenden Durchmesser (zwischen 90 und 220 nm, Tafel 36, Abb. 2). Der Übergang zwischen Netzwerkfibrillen und Pigmentkörnern in den grünen Pigmentzellen ist fließend, so daß es sich bei den größeren Verdickungen der Fibrillen ( $\varnothing$  150 nm und mehr) bereits um kleine Pigmentkörner handeln könnte (Tafel 36, Abb. 2). Das Netzwerk in grünen Pigmentzellen ist meist relativ locker, die Zwischenräume zwischen den einzelnen Fibrillen sind bis zu 5  $\mu\text{m}$  groß (also etwa 10x größer als in violetten

Pigmentzellen; vgl. Tafel 36, Abb. 1). Auch bei grünen Pigmentzellen ist im TEM an Ultradünnschnitten eine elektronendichte Auflagerung (Dicke 30–80 nm) an der Innenseite der Tonoplasten zu erkennen (Tafel 35, Abb. 3).

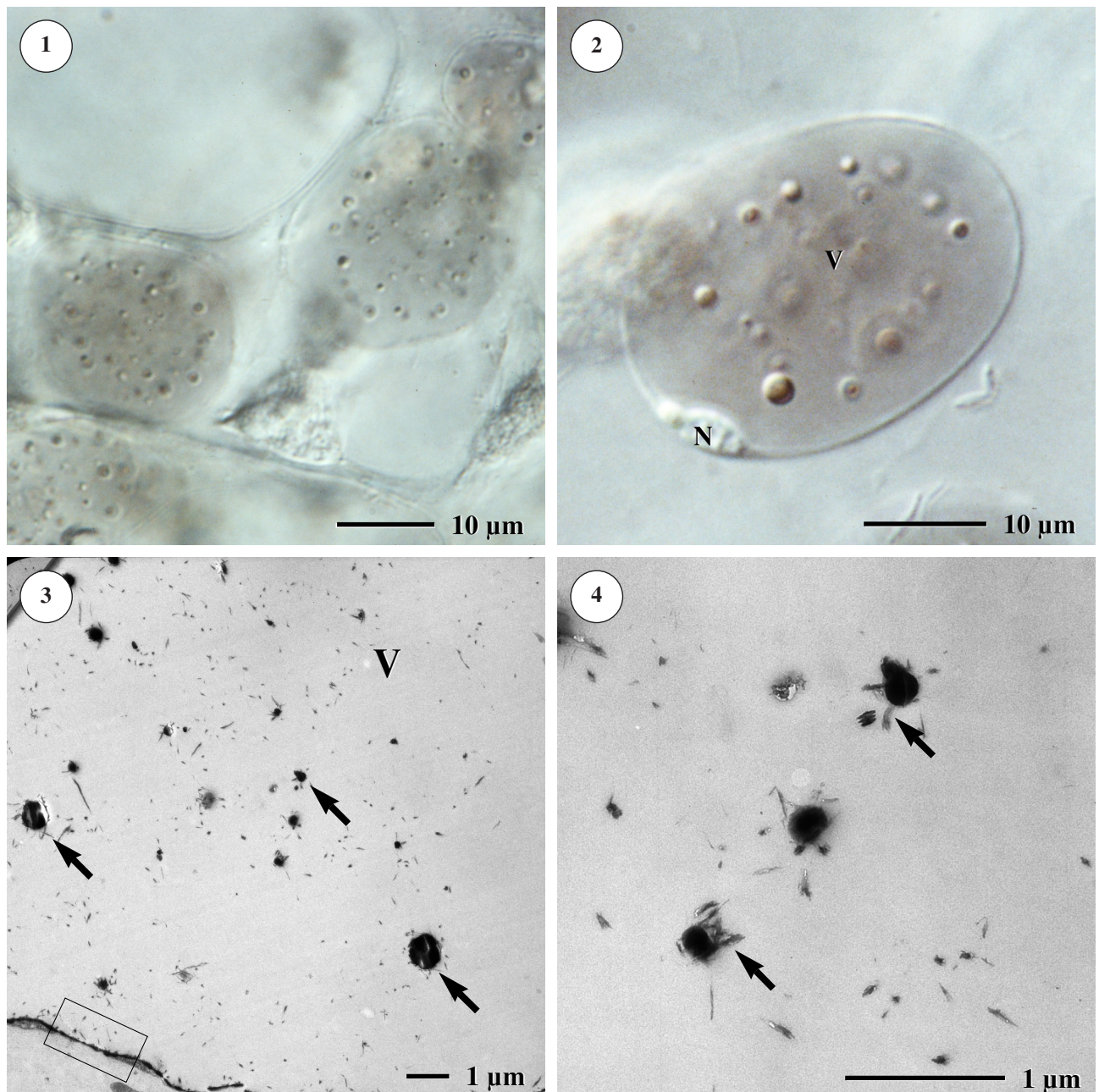
Während bei Pigmentzellen in violetten Kolonien vor allem der Grundtyp vorherrscht (Pigmentzelle mit zahlreichen kleinen und 1–3 großen Körnern und relativ dichten, glatten Netzwerkfibrillen, oligojunktionale Pigmentkörner) lassen sich in grünen Pigmentzellen mehrere Typen unterscheiden:

- **Grundtyp** (granulär, oligojunktional, Tafel 36, Abb. 1–4):  
Zellen dieses Typs enthalten mehrere bis viele kugelförmige Pigmentkörner von etwa 0,5–1 µm Durchmesser. Bruchflächen der Körner erscheinen kreisförmig. Jedes Pigmentkorn hat Kontakt mit mehreren Netzwerkfibrillen, jedoch sind zwischen den Kontaktstellen immer wieder faserfreie Oberflächenbereiche des Kornes zu erkennen. Der Grundtyp kann also als granulär und oligojunktional bezeichnet werden. Die Netzwerkfibrillen münden mit gleichbleibendem Durchmesser in das Pigmentkorn. Die Fibrillen erscheinen weitgehend gestreckt oder leicht gebogen, gewinkelte Fibrillen sind selten. Die Fibrillenoberfläche ist durch zahlreiche Verdickungen und Knötchen unregelmäßig. Das Fibrillennetzwerk ist relativ locker. Kontaktstellen zwischen Fibrillennetzwerk und Tonoplast sind selten erkennbar.
- **Polyjunktionaler Typ** (Tafel 37, Abb. 1 und 2):  
In diesen Zellen sind zahlreiche Pigmentkörner und ein dichtes Fibrillennetzwerk nachweisbar. Die Pigmentkörner haben etwa einen Durchmesser von 1–1,5 µm. Bruchflächen der Pigmentkörner erscheinen ausgezackt–sternförmig, da jedes Pigmentkorn zahlreiche Fusionsstellen mit dem Fibrillennetzwerk aufweist. Die Netzwerkfibrillen sind an den Kontaktstellen zu den Körnern häufig etwas aufgeweitet und gehen schließlich trichterförmig in die Pigmentkörner über. Freie Oberflächen von Pigmentkörnern sind praktisch nicht zu erkennen, da die Körner an allen Seiten dicht mit Fibrillen besetzt sind. Die Fibrillen erscheinen häufig mehrfach gewinkelt. Oft lassen sich in REM-Proben REM Stellen nachweisen, an denen Fibrillen des Netzwerks am Tonoplasten angeheftet sind.
- **Agranulärer Typ** (Tafel 37, Abb. 3 und 4)  
Die Vakuole dieser Zellen enthält vor allem Netzwerkfibrillen, die jedoch nicht gleichmäßig verteilt sind, sondern an mehreren Kreuzungspunkten strahlenförmig zusammenlaufen. Zu den Netzwerkkreuzungen hin nimmt der Fibrilledurchmesser etwas zu. Pigmentkörner sind in diesen Zellen nur vereinzelt ausgebildet, gelegentlich lassen sich kleine Körner (Ø meist unter 0,5 µm) zwischen den Netzwerkfibrillen nachweisen. Bei höherer Beschleunigungsspannung (10 kV) lassen sich verdichtete Bereiche im Inneren der Netzwerkkreuzungen erraten (Tafel 37, Abb. 3). Die Fibrillen sind drehrund und besitzen eine glatte Oberfläche. Verdickungen und Knötchen an den Fibrillen sind selten.

**Inhalt der grünen Pigmentzellen**

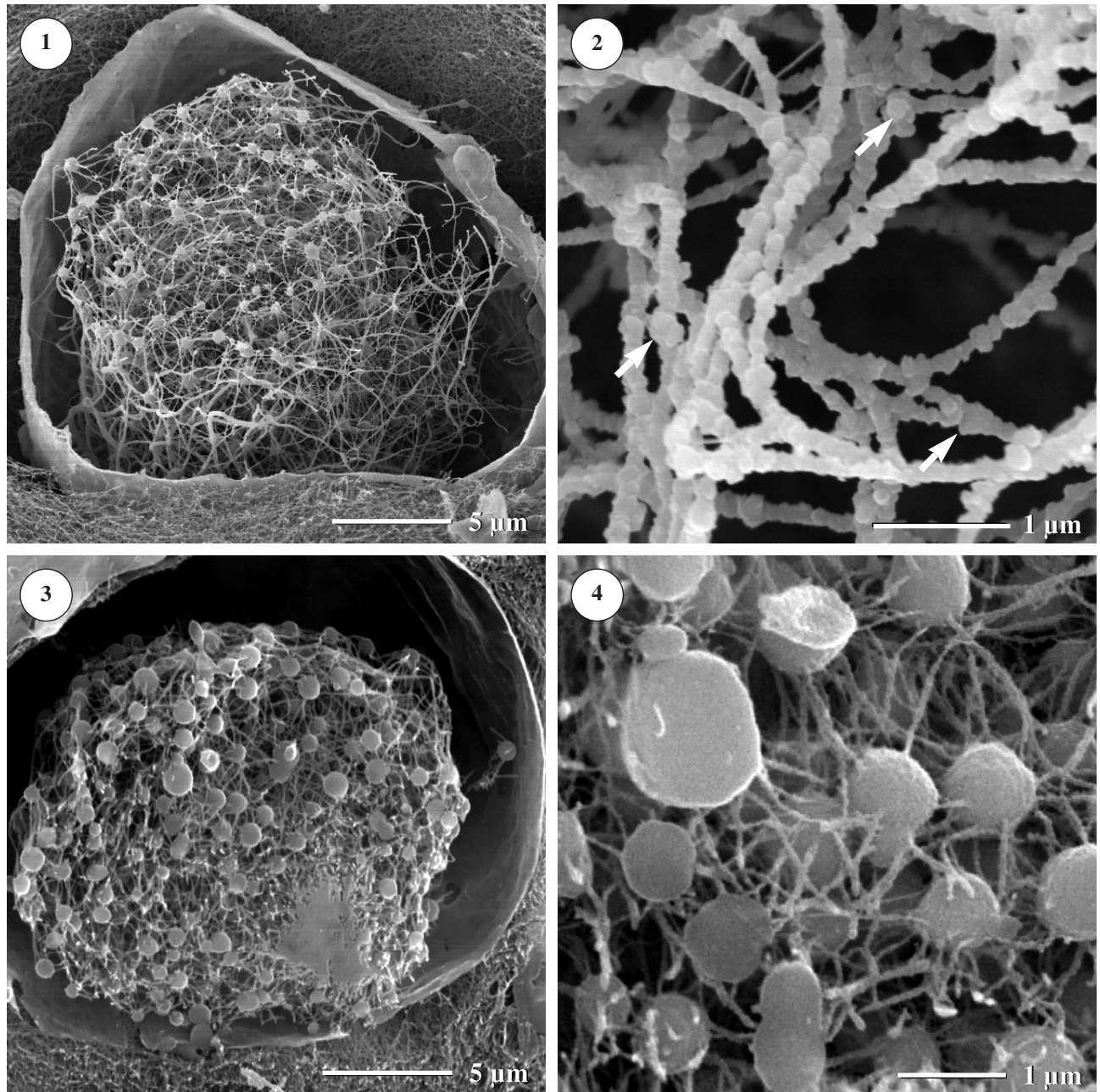
Die Vakuolen der grünen Pigmentzellen reagieren mit dem säuresensitiven Fluoreszenzfarbstoff Lyso Sensor Blue DND–167 und fluoreszieren leuchtend blau. Die Pigmentkörner zeigen keine Fluoreszenz. Mit SCHIFF'schem Reagenz, Alcianblau, Ölrot, Eosin oder in der PAS–Reaktion läßt sich die Vakuole der Pigmentzellen nicht färben, der dünne Cytoplasmasaum ist im LM nur schlecht sichtbar. Autofluoreszenz von grünen Pigmentzellen wurde nicht beobachtet. Der Zellkern kann mit Hämalaun blau gefärbt werden. Die Pigmentkörner reagieren nicht mit SCHIFF'schem Reagenz, Alcianblau, Ölrot, Eosin oder in der PAS–Reaktion. Deutlich ist hingegen die Reaktion mit Osmiumtetroxid: hierbei werden die Pigmentkörner dunkelbraun bis schwarz gefärbt. Das Netzwerk zwischen den Pigmentkörnern ist auch nach Behandlung mit Färbereagenzien im LM nicht darstellbar (Tafel 35, Abb. 1 und 2).



**Tafel 35****Pigmentzellen in grünen Kolonien**

1. LM-Aufnahme (DIC) von Pigmentzellen im Frischmaterial. Grüne Pigmentzellen enthalten meist wesentlich weniger Körner als violette Pigmentzellen.
2. LM-Aufnahme (DIC) einer Pigmentzelle im Frischmaterial. Zellkern und Cytoplasma sind peripher zu erkennen, der Großteil der Zelle wird von der Vakuole (V) ausgefüllt. Die Flüssigkeit in der Vakuole ist stets grünlich gefärbt.
3. TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch eine Pigmentzelle. In der Vakuole (V) sind nur wenige kleine Pigmentkörner (Pfeile) zu erkennen. Der Tonoplast besitzt eine charakteristische elektronendichte Auflagerung (Rahmen).
4. TEM-Aufnahme von Pigmentkörnern (Detailaufnahme von Abb. 3). Auch bei grünen Kolonien sind in den Pigmentzellen Netzwerkfibrillen (Pfeile) zu erkennen, die mit den Pigmentkörnern verbunden sind.

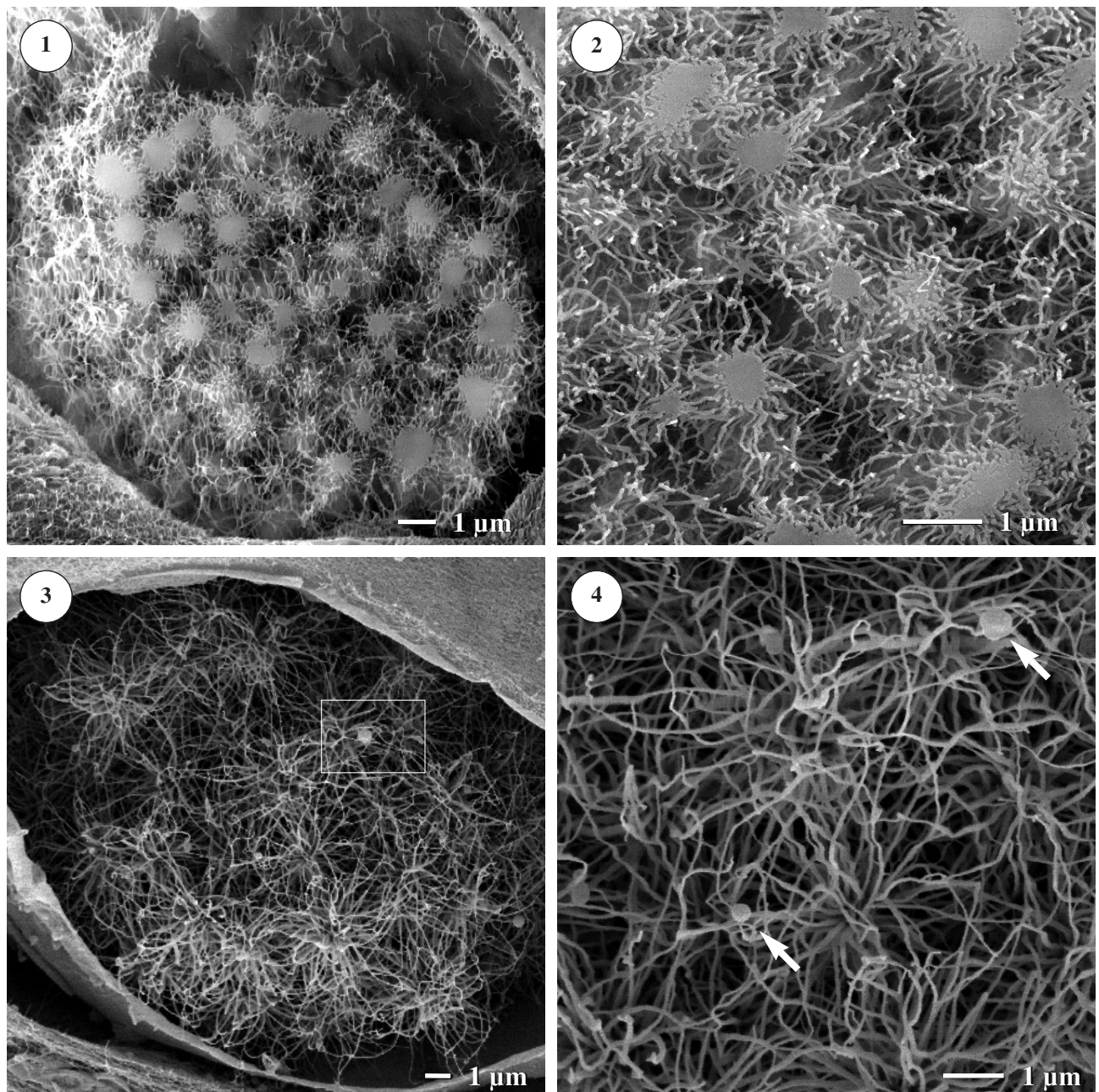


**Tafel 36**

Pigmentzellen in grünen Kolonien (REM, Gefrierbrüche nach TANAKA)

1. Übersichtsaufnahme einer grünen Pigmentzelle. Die Zelle enthält ein lockeres Geflecht aus Netzwerkfibrillen und kleine, weit voneinander entfernte Pigmentkörner.
2. Detailaufnahme der Netzwerkfibrillen einer »grünen« Pigmentzelle. An den Netzwerkfibrillen sind häufig Verdickungen (Pfeile) zu erkennen.
3. Übersichtsaufnahme einer grünen Pigmentzelle. Diese Zelle enthält viele Pigmentkörner und entspricht daher den Grundtyp-Zellen, die in violetten Kolonien vorgefunden wurden. Dieser Typ ist bei grünen Kolonien relativ selten. Die meisten grünen Pigmentzellen enthalten wesentlich weniger Körner.
4. Detailaufnahme von Pigmentkörnern und Fibrillennetzwerk der Zelle aus Abb. 3. Die Bruchflächen der Pigmentkörner erscheinen homogen und kreisförmig.



**Tafel 37**

Pigmentzellen in grünen Kolonien (REM, Gefrierbrüche nach TANAKA)

1. Übersichtsaufnahme einer polyunktionalen Pigmentzelle aus einer grünen Kolonie. Jedes Pigmentkorn hat zahlreiche Verbindungen mit dem Fibrillennetzwerk.
2. Detailaufnahme von Pigmentkörnern und Fibrillennetzwerk der Pigmentzelle aus Abb.1. Die Bruchflächen der Körner erscheinen ausgezackt-sternförmig, die Fasern gehen trichterförmig in das Pigmentkorn über. Die Fasern sind häufig »gewinkelt«.
3. REM-Aufnahme einer agranulären Pigmentzelle aus einer grünen Kolonie. In der Vakuole sind vor allem Netzwerkfibrillen zu erkennen, an Kreuzungspunkten laufen mehrere Fibrillen zusammen. Die Zelle enthält nur wenige Pigmentkörner (Rahmen).
4. Detailaufnahme von Pigmentkörnern und Fibrillennetzwerk einer agranulären Pigmentzelle. An einigen Fasern sind kleine Pigmentkörner zu erkennen (Pfeile).

### 3.3.4 Filopodiale Zellen

Zwei Typen von ausläuferbildenden, d.h. filopodialen Zellen konnten lichtmikroskopisch in der Tunika beider Farbvarianten von *C. dellechiaiei* unterschieden werden: „Granuläre“ und „vakuolisierte“ filopodiale Zellen. Beide Typen haben einen zylindrischen bis spindelförmigen Zellkörper (Länge 15–20 µm), lange, plasmatische Ausläufer (Länge häufig über 100 µm) und einen im LM kugelförmig erscheinenden Kern. Während sich die beiden Typen von filopodialen Zellen im LM z.B. anhand der unterschiedlichen Färbereigenschaften gut voneinander abgrenzen lassen, können die im TEM oder REM untersuchten filopodialen Zellen nicht mehr ohne weiteres einem der beiden Typen zugeordnet werden, da häufig Übergangsstadien auftreten bzw. nicht die ganze Zelle mit allen Bestandteilen abgebildet werden kann. Im folgenden werden jedoch die im LM erkannten und im EM erhärteten Hauptunterschiede der beiden Grundtypen dargestellt.

#### Granuläre filopodiale Zellen

Etwa 80 % der filopodialen Zellen in der Tunika *C. dellechiaiei* gehören zum granulären Typ. Bei diesem Zelltyp ist das Cytoplasma des Zellkörpers angefüllt von zahlreichen ca. 1 µm großen, im LM farblosen Granula, die den Zellen im LM und im REM ein grobkörniges Aussehen verleihen (Tafeln 38 und 39). Die Umrisslinien der Zellen haben oft konvexe Formen, die Zellen erscheinen durch die große Anzahl der in ihnen liegenden, kugelförmigen Granula manchmal regelrecht „ausgebeult“ (gut erkennbar an REM-Proben, Tafeln 38 und 39). Häufig sind an den filopodialen Zellen auch kurze, tropfenförmige Pseudopodien zu erkennen (Tafel 39, Abb. 2). Im TEM an Ultradünnschnitten können in filopodialen Zellen mindestens vier Granula-Typen unterschieden werden (s. Tabelle 8; Tafeln 40 und 41). Die Granula sind von einer einfachen, häufig undulierten Elementarmembran umgeben. Der Inhalt der Granula reagiert stark mit den verwendeten Schwermetallsalzen und erscheint daher im TEM homogen mittel- bis dunkelgrau. Häufig sind auch elektronentransparente Vesikel in den granulären filopodialen Zellen zu finden (Tafel 41, Abb. 3).

**Tabelle 8**

*Granula-Typen in granulären filopodialen Zellen*

Granula-Typ (TEM) vgl. Tafel 42	Häufigkeit in granulären filopodialen Zellen
Homogene, mäßig elektronendichte Granula (erscheinen im TEM mittelgrau) (Tafel 42-1)	+++
Mäßig bis stark elektronendichte Granula mit zentralen, negativ kontrastierten Fibrillenbündeln (Grundsubstanz grau bis schwarz, Fibrillenbündel weiß) (Tafel 42-3)	+++
Homogene, sehr elektronendichte Granula (erscheinen im TEM schwarz) (Tafel 42-2)	++
Granula mit homogenem, mäßig bis stark elektronendichtem Kernbereich und Randschicht aus lockerem, fibrillärem Material (Tafel 42-4)	+

(+++ = sehr häufig, ++ = häufig, + = selten)



Das Cytoplasma der granulären filopodialen Zellen enthält neben Granula und Vesikeln den Zellkern, viel glattes und rauhes Endoplasmatisches Reticulum (ER), Mitochondrien, Mikrofilamente und Dictyosomen (Tafel 41, Abb. 2 und 3). Die ER-Zisternen sind häufig aufgeweitet (Tafel 41, Abb. 1). Die äußere Kernmembran, die in das ER übergeht, bildet häufig Falten und Zisternen (Tafel 41, Abb. 2). Der im LM kugelförmig erscheinende Kern weist im TEM zahlreiche Lappen und Falten auf.

Die Filopodien laufen sehr fein aus, sie haben terminal etwa einen Durchmesser von 0,3–0,5 µm. Gelegentlich werden im Randbereich der Filopodien Aufwölbungen (Breite ca. 1 µm) sichtbar, die zahlreiche kleine Vesikel enthalten (Tafel 39, Abb. 3). TEM-Aufnahmen an Ultradünnschnitten zeigen vor allem feines fibrilläres Material im Cytoplasma der Filopodien.

Sehr häufig phagocytieren granuläre filopodiale Zellen in der Tunikamatrix vorkommende Bakterienzellen (Tafeln 43 und 44). Verschiedene Stadien des Phagocytosevorgangs können beobachtet werden: Zunächst bildet sich eine Falte der Plasmamembran oder ein Filopodium und umhüllt eine in der Nähe liegende Bakterienzelle (Tafel 44, Abb. 1, 2 und 3). Dann schnürt sich der eingefaltete Teil der Plasmamembran ab und bildet so ein geschlossenes Vesikel, ein Phagosom, in dem eine einzelne Bakterienzelle liegt (Tafel 44, Abb. 1, 4). Obwohl die Verschmelzung des Phagosoms mit primären Lysosomen nicht beobachtet wurde, können Bakterien intrazellulär abgebaut werden: Manche Vesikel der filopodialen Zellen enthalten teilweise verdaute Bakterienzellen (Tafel 44, Abb. 1). Wesentlich häufiger sind jedoch sogenannte Residualkörper, also nach strukturellen Gesichtspunkten lysosomale Kompartimente, die Reste verdauten Materials enthalten (Tafel 41, Abb. 4). Diese Residualkörper enthalten typischerweise lockere schleifenförmige Stapel aus Elementarmembranen, granuläres Material und homogen gefärbte Bereiche ohne erkennbare Begrenzung. Sie unterscheiden sich also von den oben beschriebenen Sekretgranula. Sie erreichen Durchmesser von 1–2 µm. Strukturell ähnliche lysosomale Kompartimente konnten in den kompartimentierten Zellen beobachtet werden (Tafel 50, Abb. 1). Filopodiale Zellen enthalten gelegentlich auch größere Vesikel mit mehreren offensichtlich intakten Bakterienzellen.

Häufig sind filopodiale Zellen (v.a. granulärer Typ) sehr eng an die Plasmamembran von Pigment- oder Blasen Zellen angelegt (Tafel 47). Der Abstand zwischen filopodiale Zelle und Pigment- bzw. Blasen Zelle beträgt an manchen Stellen dann nur noch 50–100 nm, gelegentlich können Kontakte zwischen beiden Plasmamembranen bzw. strukturell ähnliche Zellbestandteile in den benachbarten Zellen beobachtet werden (Tafel 47).

### **Vakuolisierte filopodiale Zellen**

Im LM erscheinen vakuolisierte filopodiale Zellen farblos und ohne zahlreiche Granula. Die Zellumrisse sind häufig konkav (Tafel 46, Abb. 2), die Ausläufer oft besonders lang. Im Inneren der Zellen sind lichtmikroskopisch wenige, relativ große transparente „Vakuolen“ erkennbar (Tafel 45, Abb. 1 und 2; Tafel 46, Abb. 2).

Im EM kann die Unterscheidung zwischen granulären und vakuolisierten filopodialen Zellen jedoch nicht immer nachvollzogen werden. Es kommen mehrere Zellformen für ein im LM „vakuolisiertes“ Erscheinungsbild in Frage. Zum Beispiel können ehemals granuläre filopodiale Zellen nach Entleerung ihrer Granula nur noch transparente Vesikel enthalten, die lichtmikroskopisch nicht sichtbar sind. Eine weitere Möglichkeit sind Zellen ohne oder mit sehr wenigen bzw. kleinen Granula, deren cytoplasmatische Elemente im LM ebenfalls transparent erscheinen (Tafel 45, Abb. 3, 4). Beide Formen können regelmäßig in Ultradünnschnitten der Tunika nachgewiesen werden. In jedem Fall sind vakuolisierte filopodiale Zellen durch das weitgehende Fehlen von elektronendichten Granula gekennzeichnet.

Im REM sind nach Entfernung der Zooide zahlreiche netzwerkartig angeordnete filopodiale Zellen im Zooidhohlraum (Tafel 48, Abb. 1) zu erkennen. Sie liegen frei auf der Zooidraumwand und reichen mit ihren Ausläufern in die Tunikamatrix hinein (Tafel 48, Abb. 2). Die Abstände zwischen den einzelnen Zellen sind hier besonders regelmäßig (etwa 15–20 µm). Manchmal sind die filopodialen Zellen an der Zooidraumwand nicht völlig frei, sondern von einer dünnen Schicht Matrixmaterial umgeben. In unmittelbarer Nähe der filopodialen Zellen erscheint die Fasermatrix der Zooidraumwand meist gelockert, die Zwischenräume der Matrixfasern erreichen Durchmesser von 3–4 µm. In 4–8 µm Entfernung von den filopodialen Zellen liegen die Matrixfasern wieder sehr dicht, die Abstände zwischen den Fasern sind maximal 0,5 µm groß.

### Inhalt der filopodialen Zellen

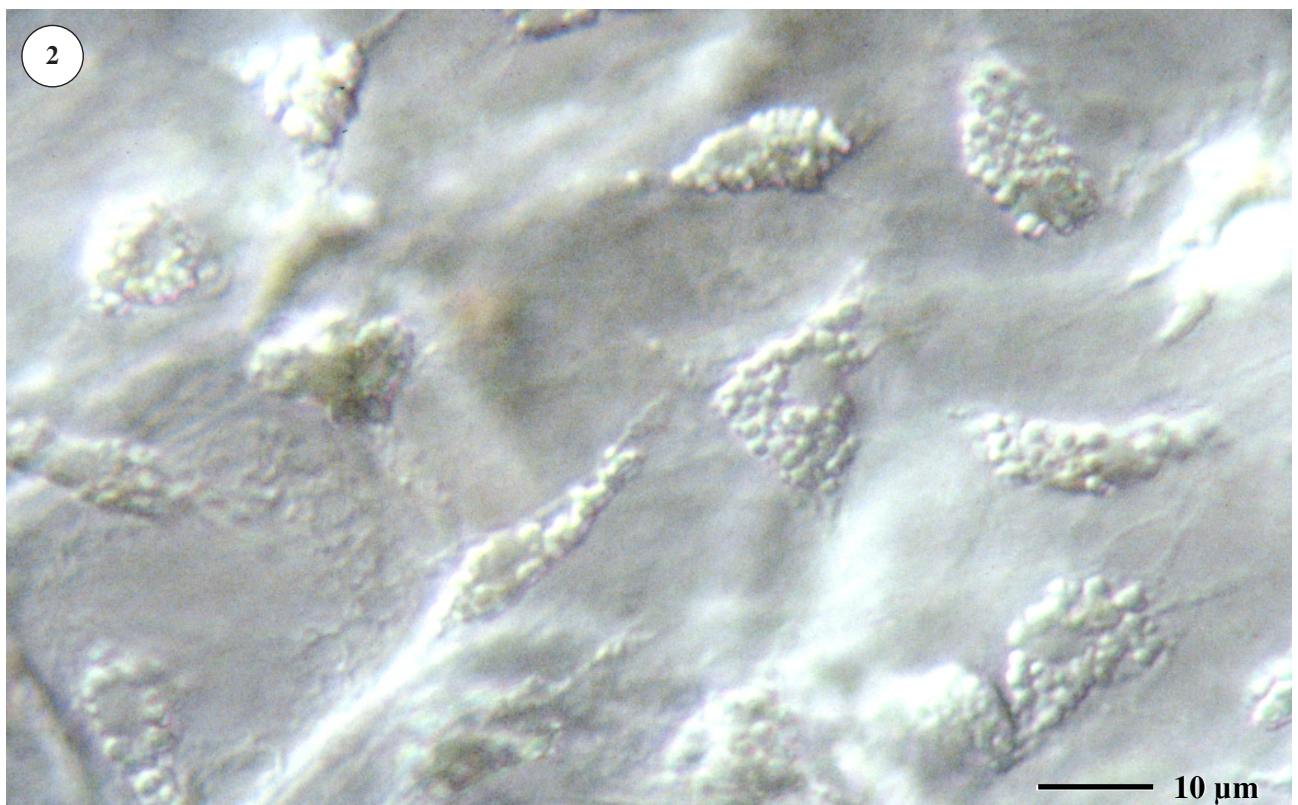
Die beiden Typen von filopodialen Zellen (granulärer und vakuolisierter Typ) konnten anhand ihres Färbeverhaltens deutlich voneinander unterschieden werden (s. Tabelle 9). Während die Granula des granulären Typs mit den meisten Färbereagenzien gut angefärbt wurden, blieben die „Vakuolen“ des vakuolisierten Typs stets farblos. Schwächer als die Vakuolen der Blasen- und Pigmentzellen fluoreszierten die Vakuolen der filopodialen Zellen mit dem säuresensitiven Farbstoff Lyso Sensor Blue DND-167. Filopodiale Zellen zeigen Autofluoreszenz: Bei UV-Anregung (365 nm) fluoresziert das Cytoplasma schwach gelborange, bei Blaugrün-Anregung (485 nm) schwach grün. Grünanregung (546 nm) läßt das Cytoplasma bis in die Ausläufer hinein kräftig rot fluoreszieren, die Granula der granulären filopodialen Zellen fluoreszieren ebenfalls rot. Filopodiale Zellen zeigen damit charakteristische Autofluoreszenz, wie sie auch an Säugerzellen beobachtet werden kann (AUBIN 1979).

**Tabelle 9**

*Färbeverhalten der filopodialen Zellen*

<b>Färbereagenz</b>	<b>Granula</b>	<b>Vakuolen</b>
PAS Reaktion	++	–
Toluidinblau	+++	–
Osmiumtetroxid	++	–
Eosin	++	–
Alcianblau pH 2,5	–	–
Alcianblau pH 1	–	–

(+++ = starke Färbung, ++ = mittelstarke Färbung, + = schwache Färbung, – = keine Färbung)

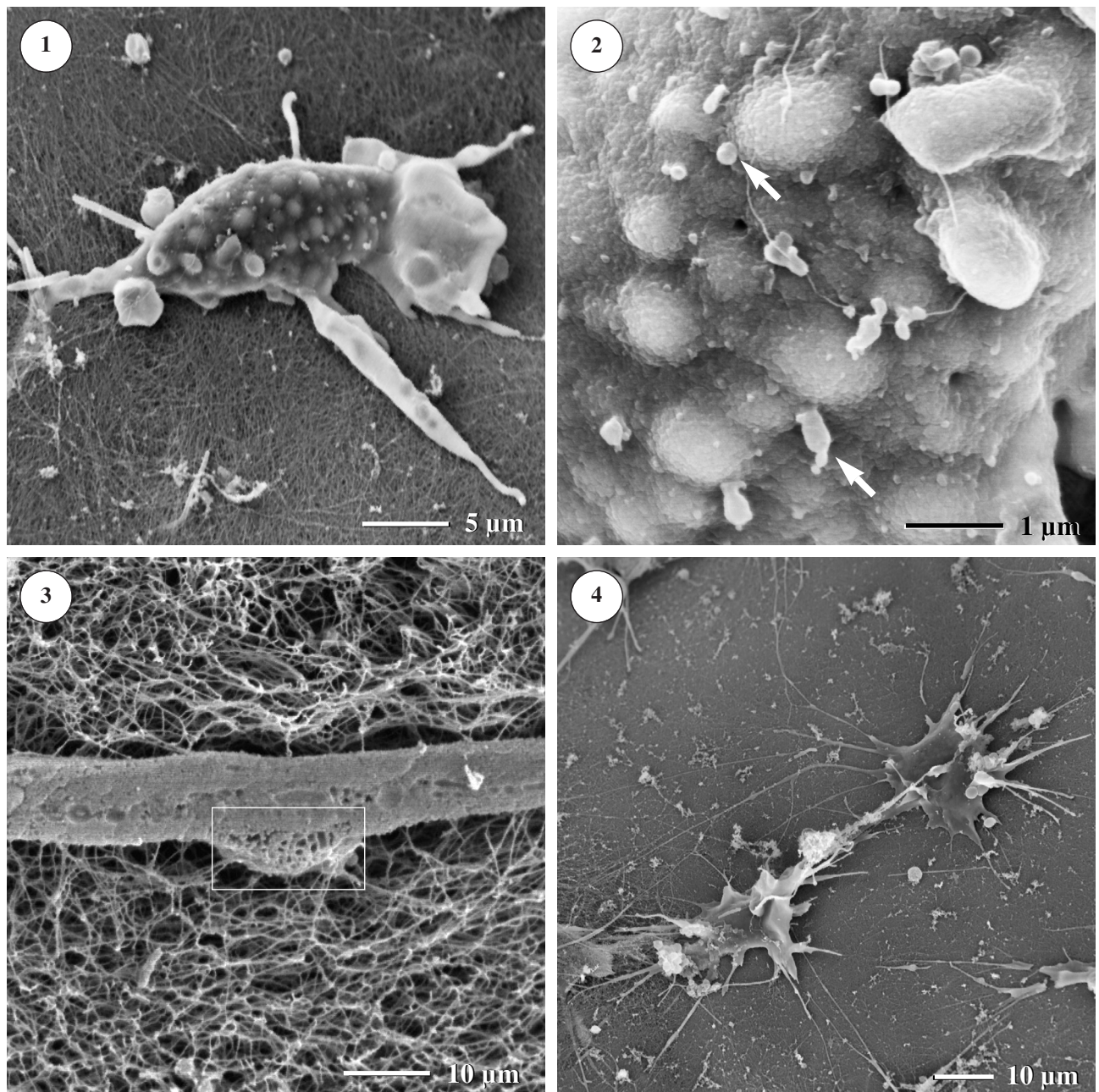


### Tafel 38

#### Granuläre filopodiale Zellen (LM)

1. LM-Aufnahme (ODIC) einer granulären filopodialen Zelle (Paraffinschnitt, s. Färbung: Hämalaun, Eosin). Der Zellkern ist durch Hämalaun blauviolett, die Granula durch Eosin rötlich gefärbt.
2. LM-Aufnahme von granulären filopodialen Zellen in der subcuticulären Schicht einer grünen Kolonie (Frischmaterial, Handschnitt). Diese Schicht enthält sehr viele filopodiale Zellen.

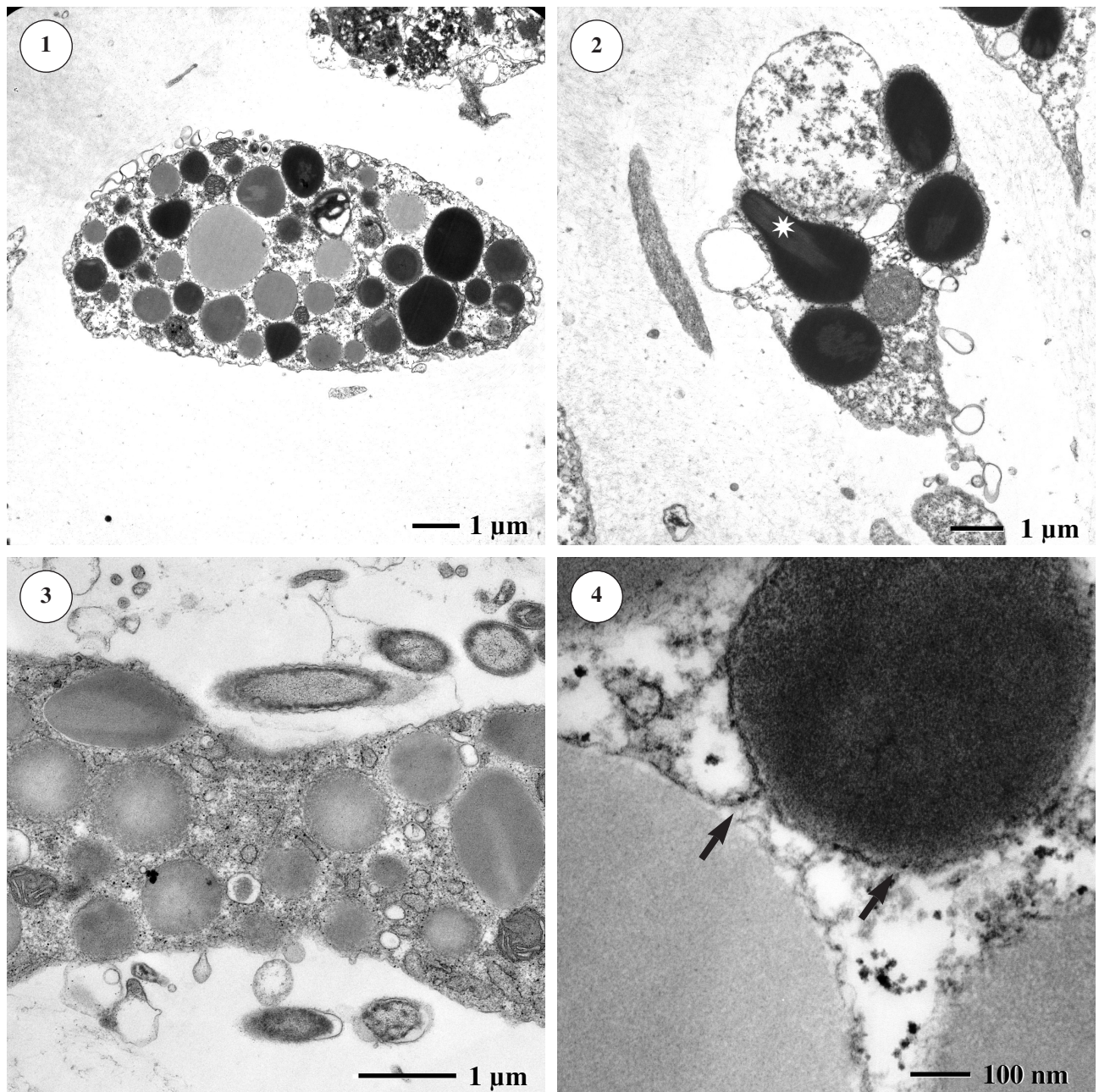


**Tafel 39**

Granuläre filopodiale Zellen (REM, Kryobrüche nach TANAKA)

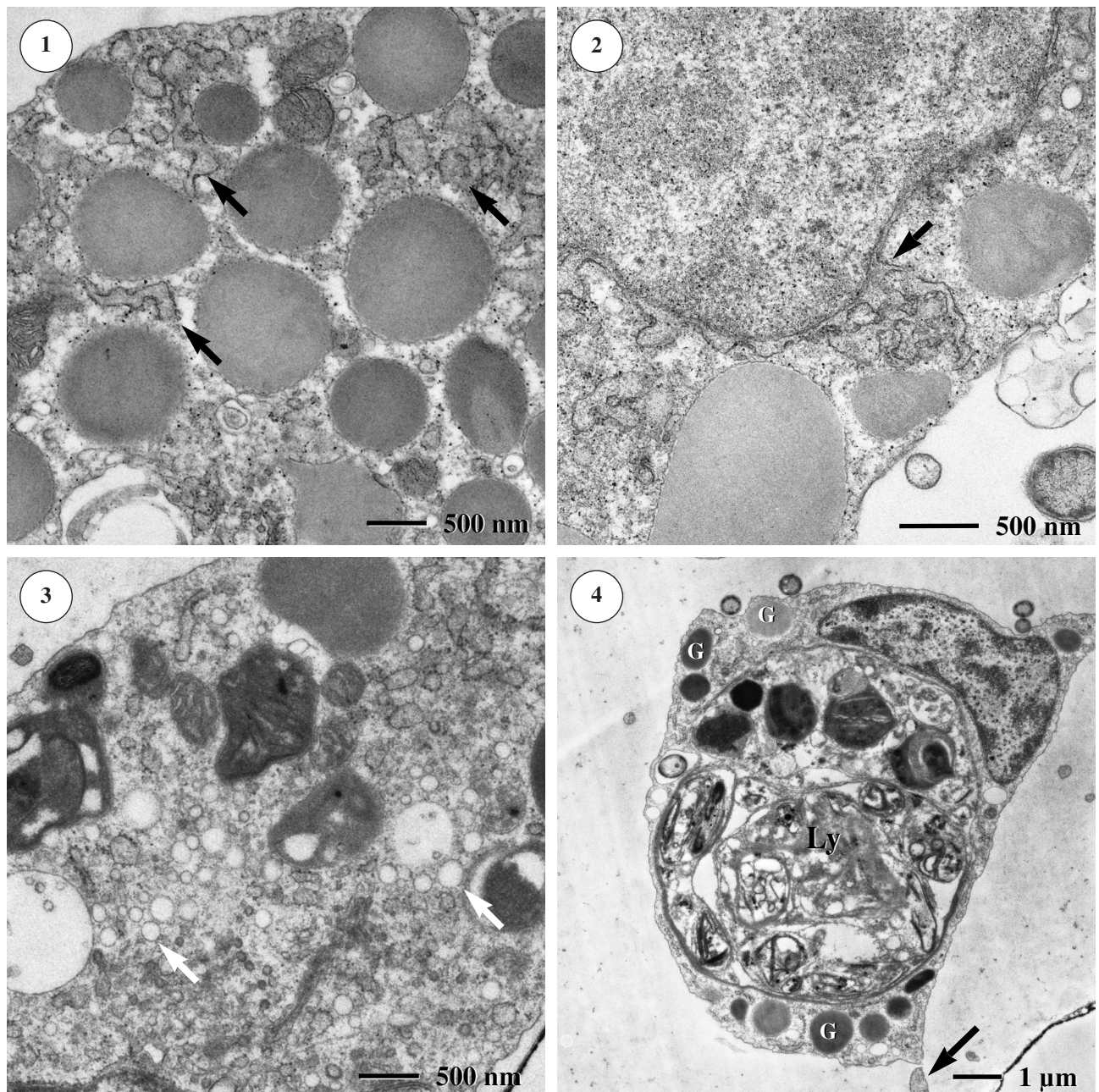
1. Granuläre filopodiale Zelle. In der Zelle liegen zahlreiche kugelförmige Granula.
2. Detailaufnahme der granulären filopodialen Zelle aus Abb. 1. Die Zellen bilden häufig kurze, tropfenförmige Protrusionen (Pfeile).
3. In aufgebrochenen Filopodien sind gelegentlich Aufwölbungen unter der Plasmamembran erkennbar, in denen zahlreiche kleine Vesikel liegen (Rahmen).
4. An manchen Stellen (hier: Zooidhohlraum) bestehen netzwerkartige Verbindungen zwischen den filopodialen Zellen.



**Tafel 40****Granuläre filopodiale Zellen (TEM)**

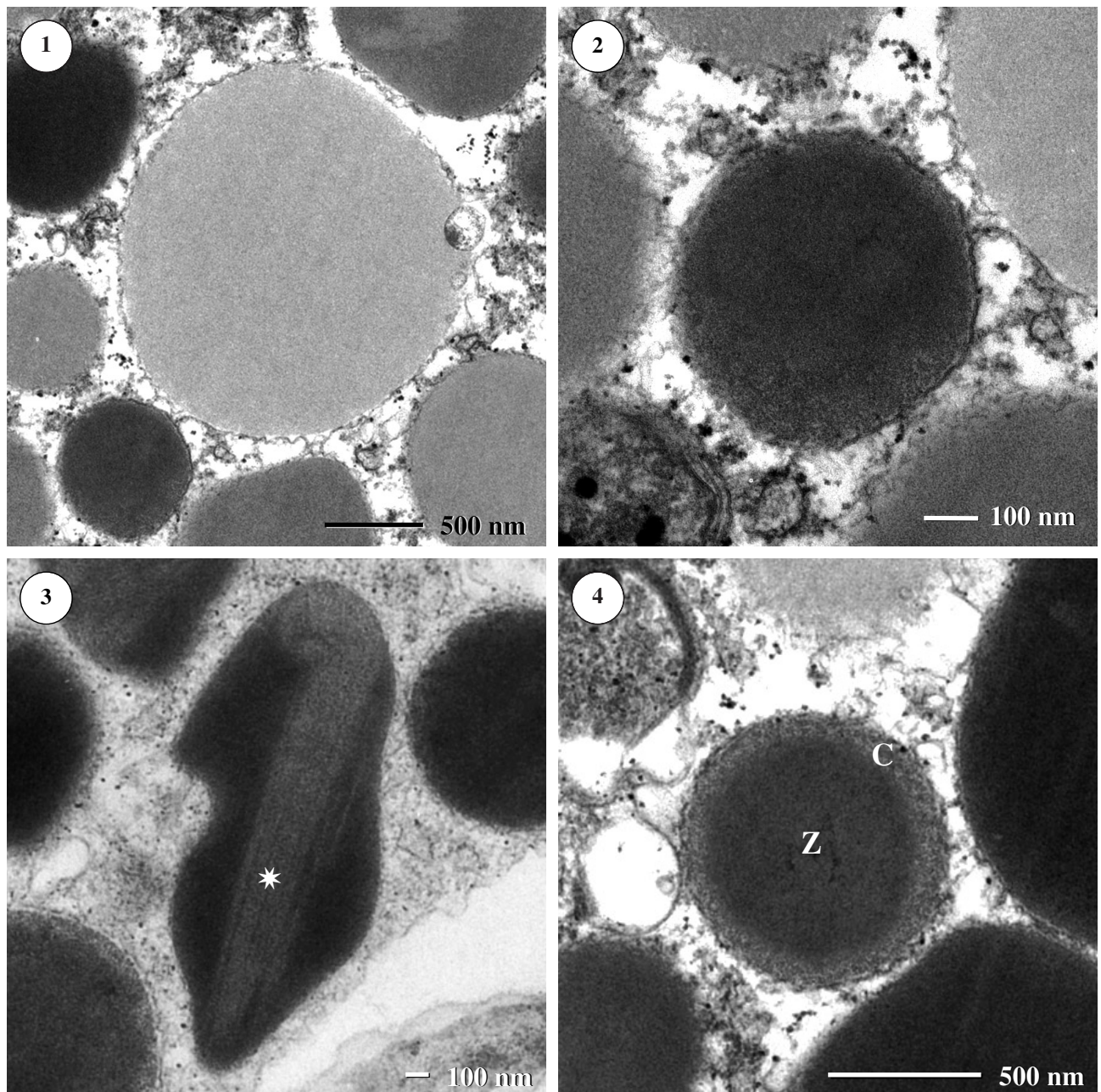
1. TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch eine granuläre filopodiale Zelle. Die einzelnen Granula unterscheiden sich in Größe und Elektronendichte.
2. Granuläre filopodiale Zelle mit mehreren elektronendichten Granula. Die Granula enthalten hellere Myelinstrukturen (Stern).
3. Granuläre filopodiale Zelle mit einheitlichen, mäßig elektronendichten Granula.
4. Verschieden elektronendichte Granula mit undulierten Begrenzungsmembranen (Pfeile).



**Tafel 41****Granuläre filopodiale Zellen (TEM)**

1. Detailaufnahme einer granulären filopodialen Zelle. Die Membranen sind häufig unduliert, die Zisternen aufgeweitet (Pfeile).
2. Detailaufnahme des Zellkerns einer granulären filopodialen Zelle. Die äußere Kernmembran bildet zahlreiche Falten und ist mit dem ER verbunden (Pfeil).
3. Detailaufnahme einer granulären filopodialen Zelle. Im Cytoplasma sind häufig zahlreiche elektronentransparente Vesikel nachweisbar (Pfeile).
4. Filopodiale Zelle mit wenigen Granula und großem lysosomalen Kompartiment. Pfeil = Filopodium, G = Granulum, Ly = Lysosomales Kompartiment.



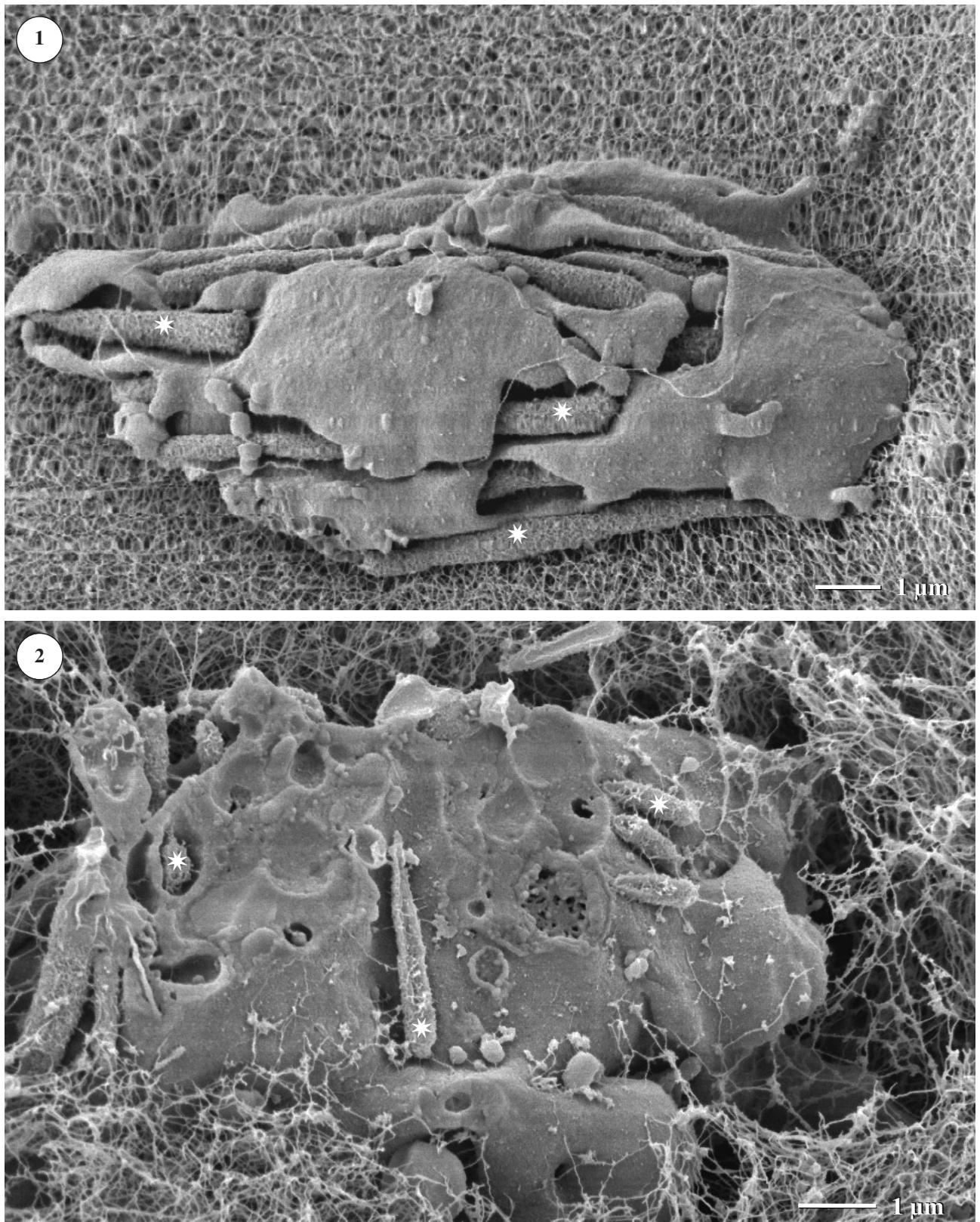


#### Tafel 42

Granula-Typen der granulären filopodialen Zellen (TEM)

1. Homogenes, mäßig elektronendichtes Granulum.
2. Homogenes, elektronendichtes Granulum (Übersichtsaufnahme von Tafel 40, Abb. 4).
3. Elektronendichtes Granulum mit helleren Myelinstrukturen (Stern).
4. Granulum mit homogenem, elektronendichtem Zentralbereich (Z) und Cortex (C) aus fein-fibrillärem Material.



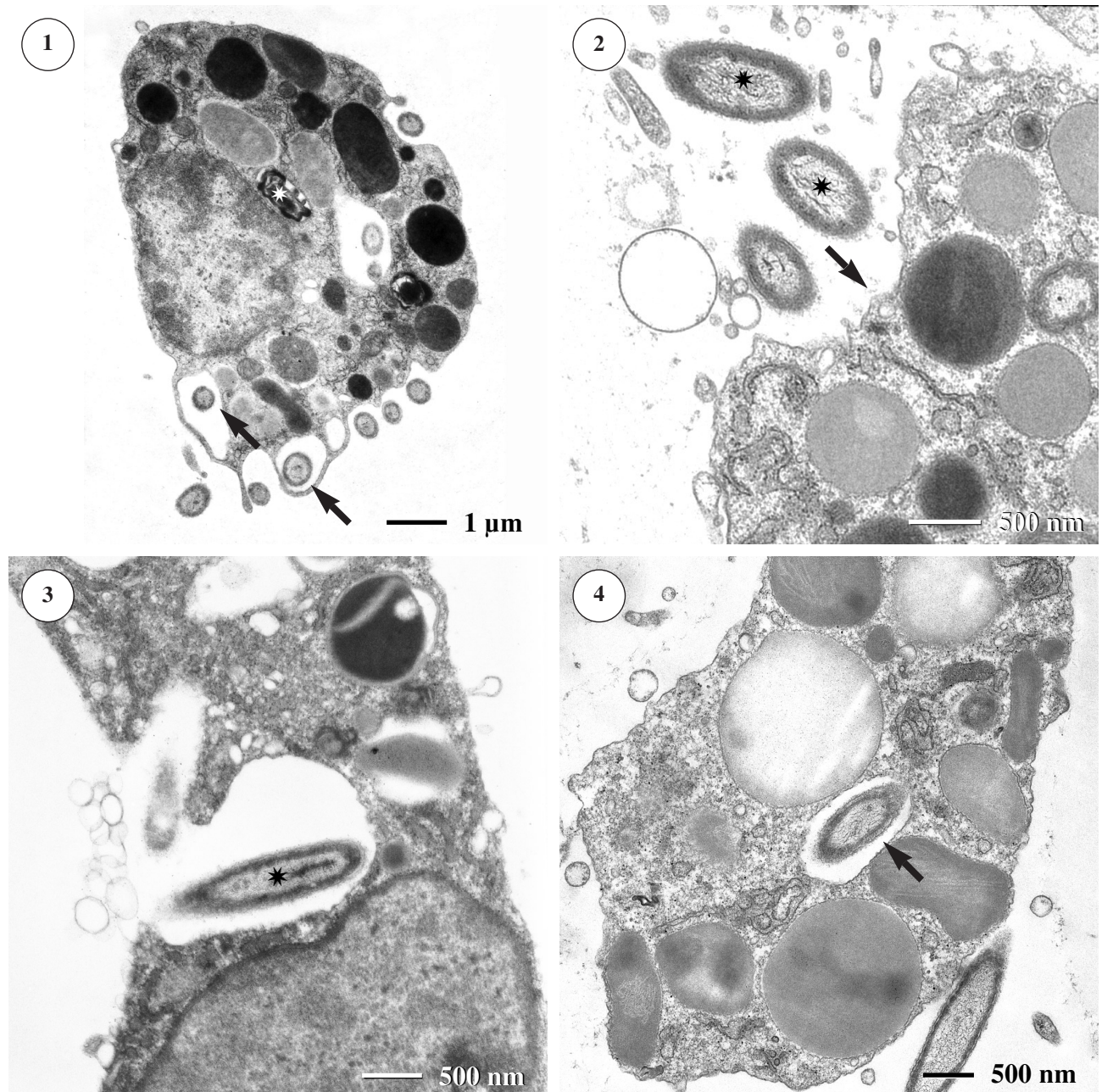


**Tafel 43**

Filopodiale Zellen, Phagocytose von Bakterien (REM)

1. REM-Aufnahme einer im Zooidhohlraum auf der Tunikamatrix liegenden filopodialen Zelle. Bakterienzellen (Sterne) werden von Plasmafalten umhüllt und so von der Zelle aufgenommen.
1. REM-Aufnahme einer gefroren aufgebrochenen filopodialen Zelle (Kryobrush nach TANAKA). Im Inneren der Zelle sind einige aufgebrochene Bakterienzellen zu erkennen (Sterne).



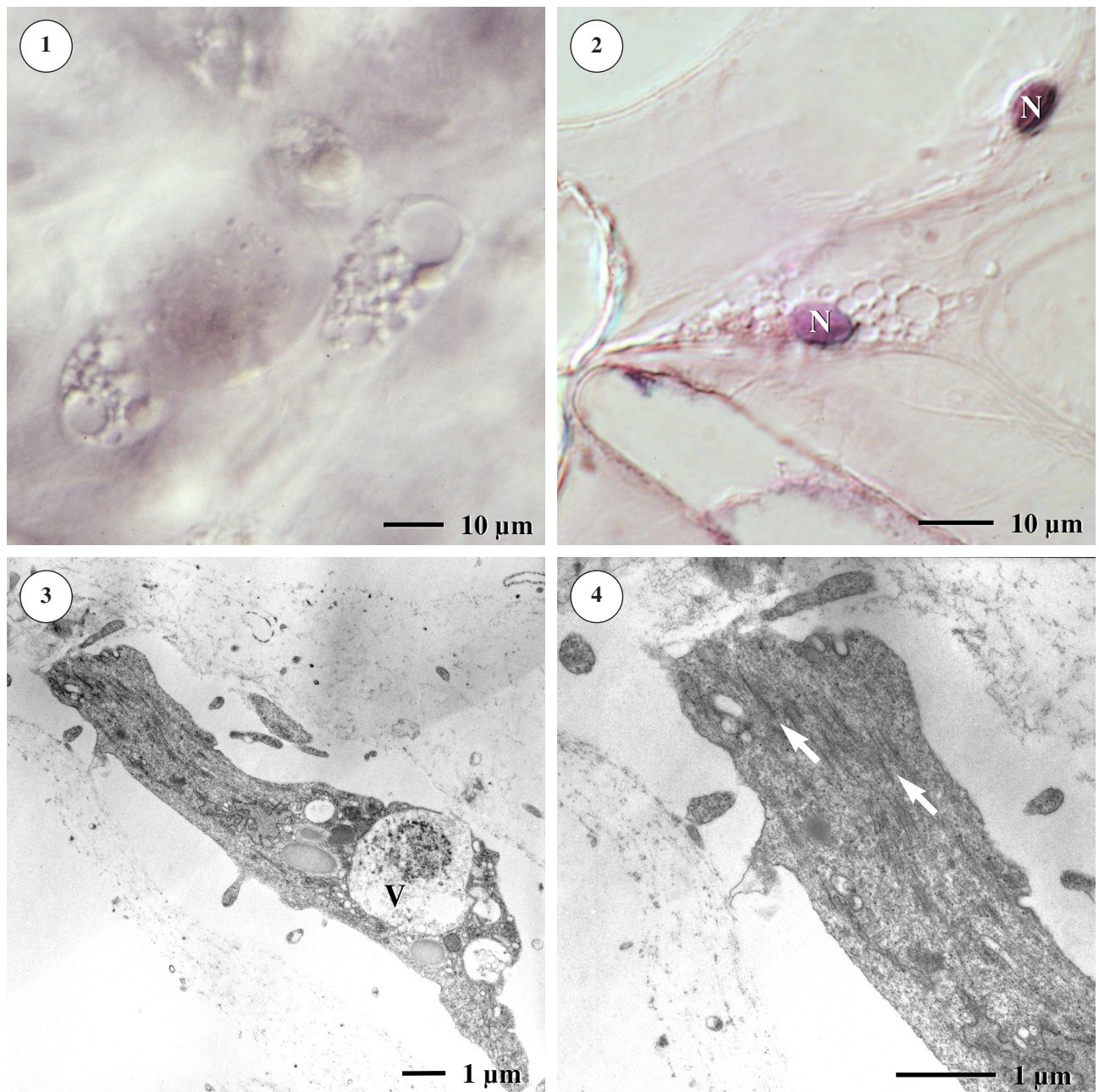


#### Tafel 44

##### Filopodiale Zellen, Phagocytose von Bakterien (TEM)

1. TEM-Aufnahme einer granulären filopodialen Zelle. Die Zelle phagocytiert zahlreiche Bakterienzellen (Pfeile). Ein Phagocytosevesikel enthält eine teilweise verdaute Bakterienzelle (Stern; Detailaufnahme s. Tafel 58, Abb. 6).
2. Detailaufnahme einer (granulären) filopodialen Zelle und mehrerer Bakterienzellen (Sterne). Der Phagocytosevorgang beginnt mit der Invagination der Plasmamembran der filopodialen Zelle (Pfeil).
3. Detailaufnahme einer filopodialen Zelle während der Phagocytose. Um das Bakterium (Stern) bildet die filopodiale Zelle eine Zellfalte aus.
4. Detailaufnahme einer filopodialen Zelle nach Phagocytose einer Bakterienzelle. Die Bakterienzelle liegt in einem Phagocytosevesikel (Pfeil).

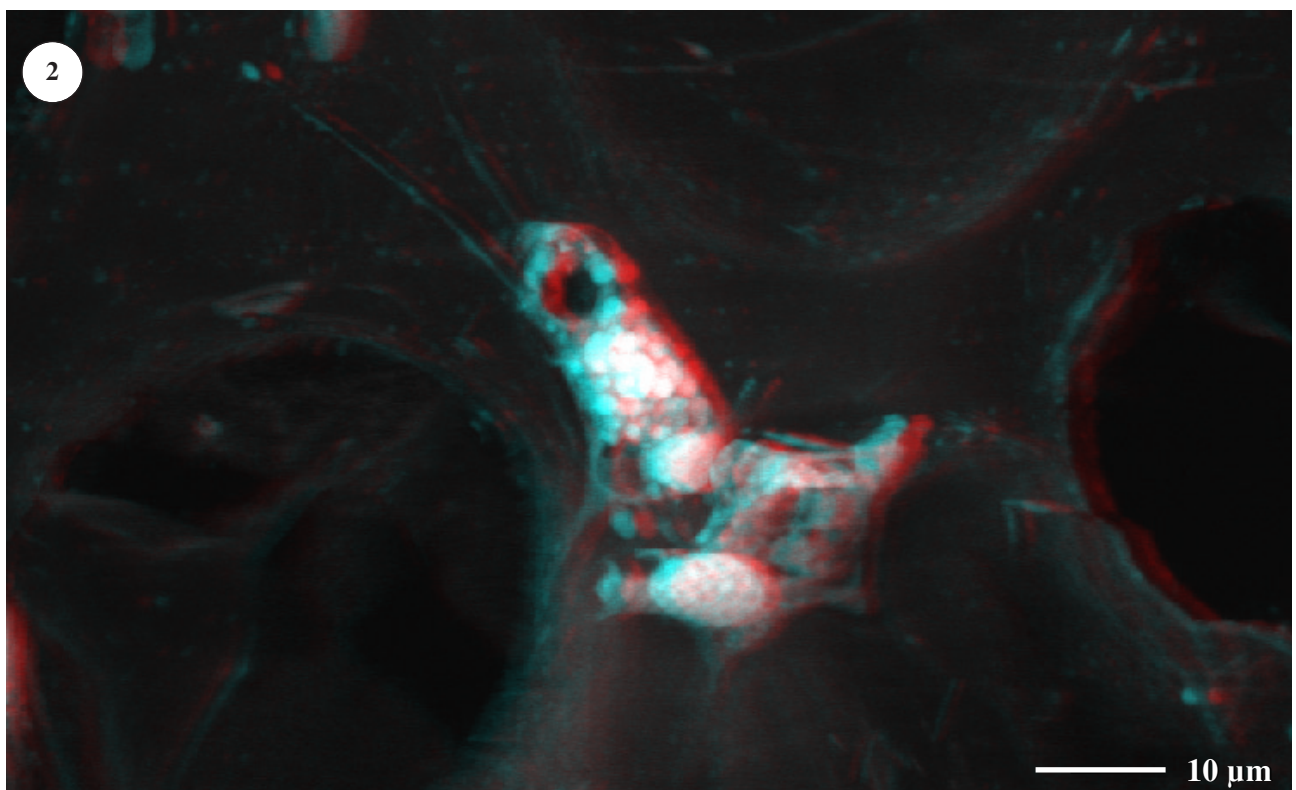
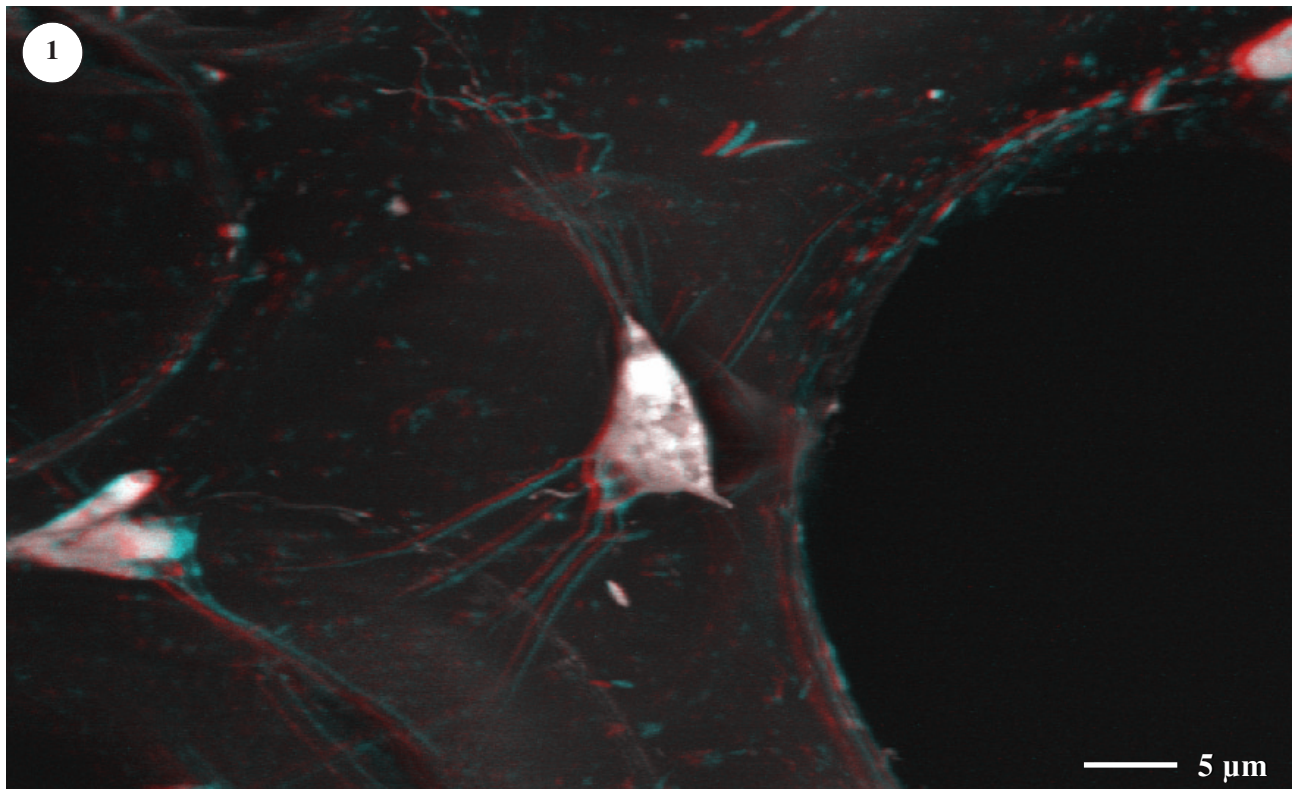




#### Tafel 45

##### Vakuolierte filopodiale Zellen

1. Lichtmikroskopische Aufnahme (DIC) einer vakuolierten filopodiale Zelle (Frischmaterial). Die Zellen sind transparent und enthalten mehrere Vakuolen.
2. Lichtmikroskopische Aufnahme (DIC) einer vakuolierten filopodiale Zelle. Der Zellkern (N) ist mit Hämalaun färbbar.
3. TEM Aufnahme einer (vakuolierten?) filopodiale Zelle im Ultradünnschnitt.
4. TEM- Detailaufnahme der filopodiale Zelle aus Abb. 3. Im Cytoplasma sind Mikrofilamente erkennbar (Pfeile).



#### Tafel 46

3D-Aufnahmen filopodiale Zellen (Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie)



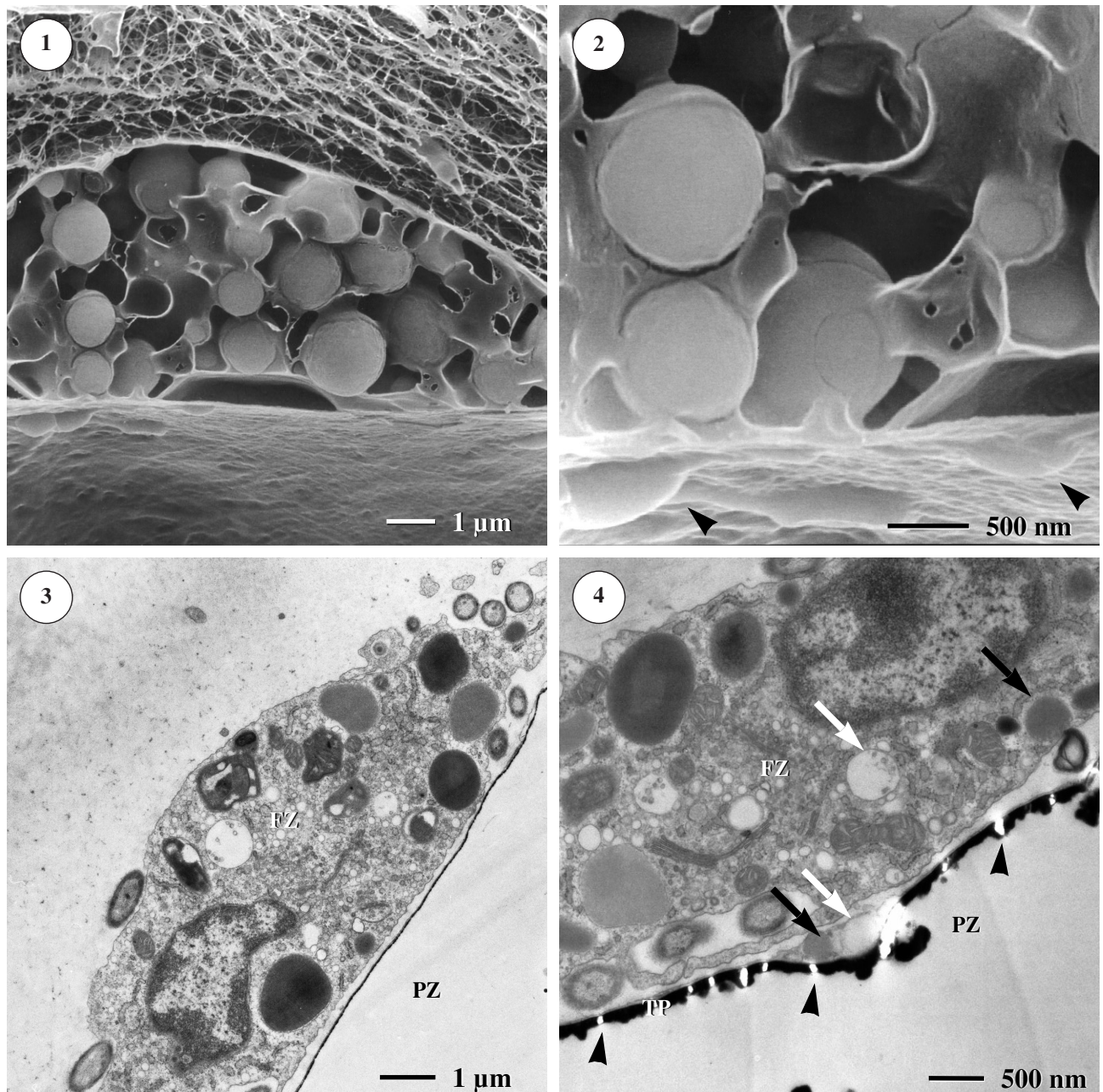
(Bitte Rot-Blau-Brille verwenden; s. letzte Seite)

1. Granuläre filopodiale Zellen haben eine konvexe Zellform. Die Granula zeigen Autofluoreszenz.

Anregungswellenlänge: 488 nm.

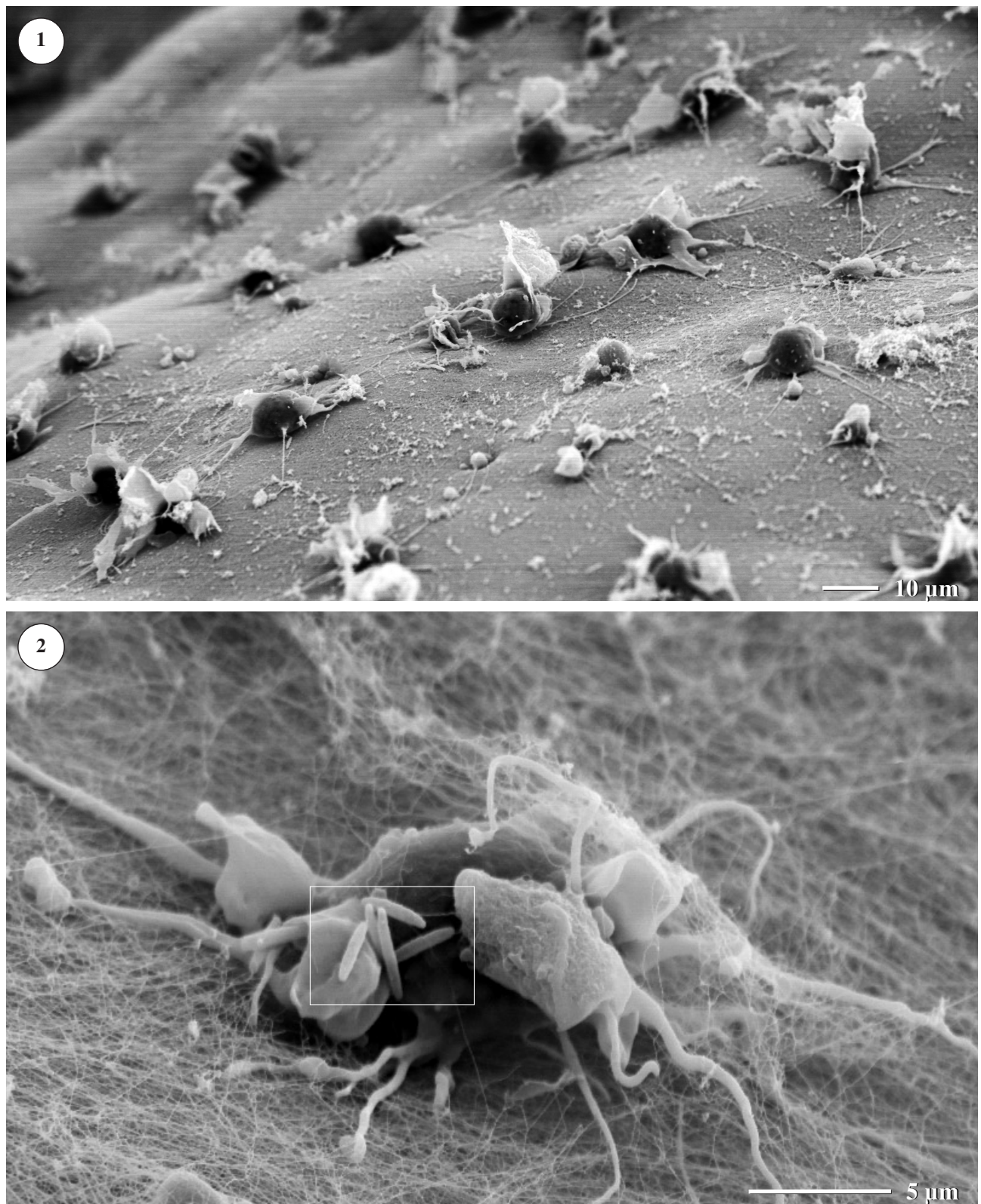
2. Vakuolisierte filopodiale Zellen haben häufig konkave Umrisse. Anregungswellenlänge: 488 nm.



**Tafel 47****Filopodiale Zellen, Kontakte zu Pigmentzellen**

1. Kryo-Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer granulären filopodialen Zelle, die unmittelbar an einer Pigmentzelle anliegt.
2. Detailvergrößerung der Kontaktstelle aus Abb. 1. An der Innenseite des Tonoplasten der Pigmentzelle sind Aufwölbungen sichtbar (Pfeilspitzen).
3. TEM-Aufnahme einer Kontaktstelle zwischen filopodiale Zelle und Pigmentzelle. Der Abstand zwischen Pigmentzelle (PZ) und filopodiale Zelle (FZ) beträgt nur ca. 50 nm.
4. TEM-Detailaufnahme der Kontaktstelle zwischen einer filopodialen Zelle und einer Pigmentzelle. Im Cytoplasma der Pigmentzelle (PZ) lassen sich nahe der Kontaktstelle zur filopodialen Zelle ähnliche Zellstrukturen (Granula, Vesikel) beobachten, wie sie auch in der filopodialen Zelle (FZ) nachgewiesen werden können (Vesikel: weiße Pfeile; Granula: schwarze Pfeile). Der Tonoplast (TP) der Pigmentzelle bildet in Nähe der Kontaktstelle eine Aufwölbung. Der stark osmiophile Belag auf dem Tonoplasten zeigt zahlreiche Bruchstellen (Pfeilspitzen).





**Tafel 48**

Filopodiale Zellen im Zooidhohlraum (REM)

1. Übersichtsaufnahme der Innenwand des Zooidhohlraums. Filopodiale Zellen liegen in sehr regelmäßigen Abständen zueinander auf der Innenwand.
2. REM-Aufnahme einer filopodialen Zelle im Zooidhohlraum. Die Zelle liegt der Hohlraumwand auf und ist mit ihren Filopodien in der Fasermatrix verankert. Auf der filopodialen Zelle liegen mehrere stäbchenförmige Bakterienzellen (Rahmen).

### 3.3.5 Kompartimentierte Zellen

Kompartimentierte Zellen haben einen Durchmesser von 15–20 µm. Der Zellkern ist etwa 5 µm groß. Im LM (ungefärbte Schnitte) fallen diese Zellen vor allem durch ihre Farbe auf: Während die meisten Tunikastrukturen mit Ausnahme der Pigmentzellen farblos und mehr oder weniger transparent erscheinen, sind die kompartimentierten Zellen hellgelb bis bräunlich (Tafel 49, Abb. 1 und 2). Die Zellen sind kugelförmig, erscheinen aber an manchen Stellen durch die im Inneren liegenden, dicht gepackten Zellorganellen unregelmäßig „ausgebeult“. Diese charakteristische Zellform wird vor allem bei dreidimensionaler Darstellung der Zellen im Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (KLSM) und im REM sichtbar (Tafeln 51, 52).

Im REM und TEM (Tafeln 49 und 50) werden in den kompartimentierten Zellen neben dem meist in die Zellperipherie gedrückten Zellkern hauptsächlich relativ große, membranumgrenzte Kompartimente (Ø ca. 5 µm) sichtbar, die nach strukturellen Kriterien den Lysosomen zuzuordnen sind. Sie enthalten häufig voluminöse Stapel von Membranen. Die Membranen lagern sich meist zu lockeren schlaufenförmigen oder – bei dichter Packung – myelinartigen Stapeln zusammen und füllen dann den größten Teil der kompartimentierten Zellen aus (Tafel 50). Die Membranstapel erscheinen im TEM aufgrund ihrer Reaktionsfähigkeit mit Kontrastierungsmitteln mittel- bis dunkelgrau (Tafel 50).

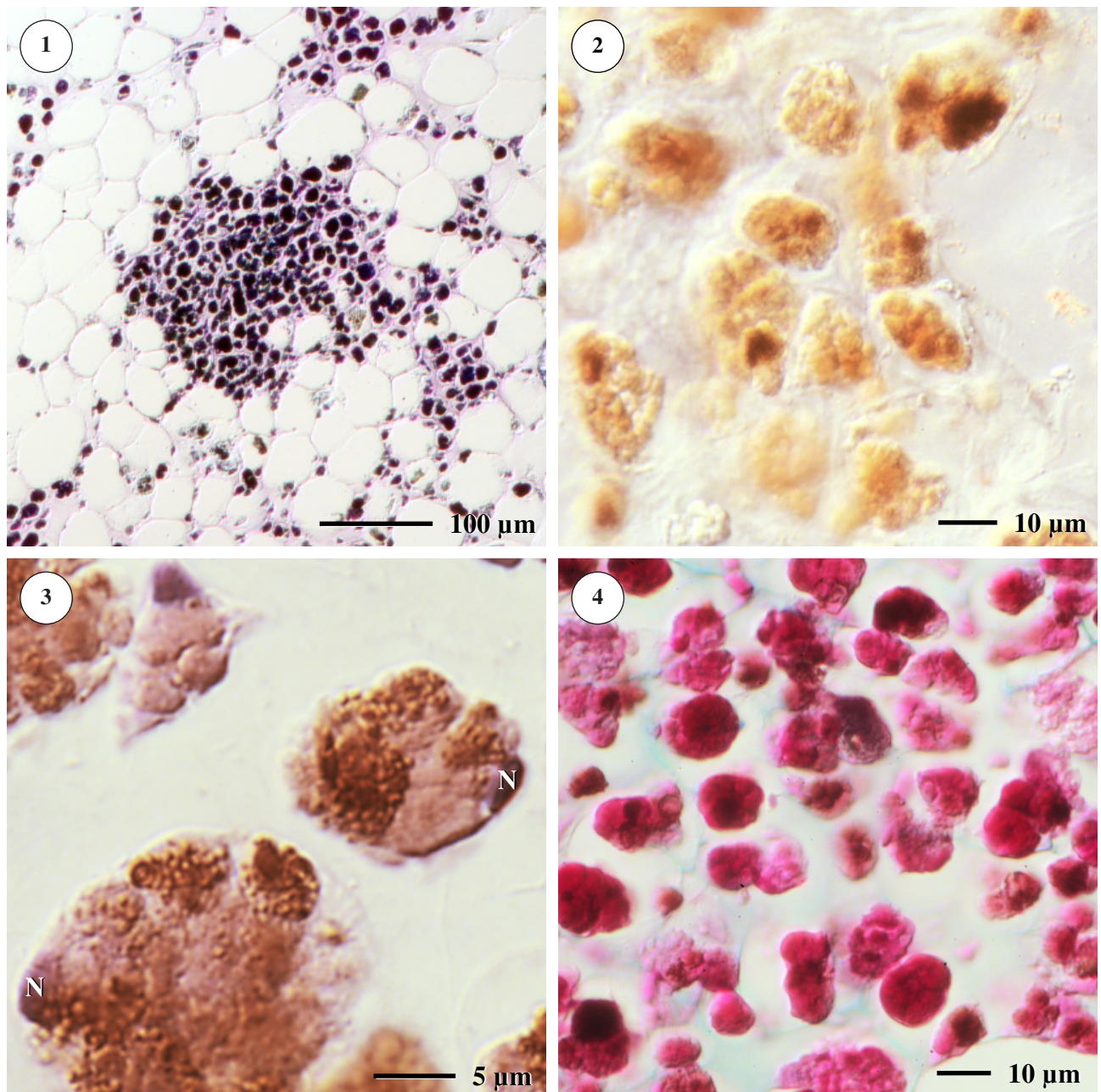
Kompartimentierte Zellen enthalten häufig auch zahlreiche elektronentransparente Vesikel und elektronendichte Granula. (Tafel 50). Die granulären Ablagerungen befinden sich meist in den lysosomalen Bereichen der kompartimentierten Zellen und reagieren sehr stark mit den verwendeten Kontrastierungsmitteln, sie erscheinen im TEM schwarz (Tafel 50, Abb. 3). Die einzelnen Körner haben einen Durchmesser von 50–200 nm, manchmal fusionieren sie auch zu elektronendichten Ballen von 500–800 nm Durchmesser.

Neben granulärem und membranösem Material wurden in kompartimentierten Zellen häufig große Mengen an Bakterienzellen nachgewiesen (Tafel 51, Abb. 4). Dabei handelt es sich meist um Gram-positive Stäbchen (vgl. Abschnitt 3.4.2). In manchen kompartimentierten Zellen sind die Bakterien sehr dicht gepackt, so daß lokal Bakteriendichten von maximal  $10^{11}$  Zellen/ml erreicht werden (Tafel 50, Abb. 4). Auffallend ist, daß in diesen Zellen dann fast ausschließlich intakte und kaum verdaute Bakterienzellen vorliegen.

Die kompartimentierten Zellen lassen sich nach ihren strukturellen Merkmalen in drei Gruppen einteilen:

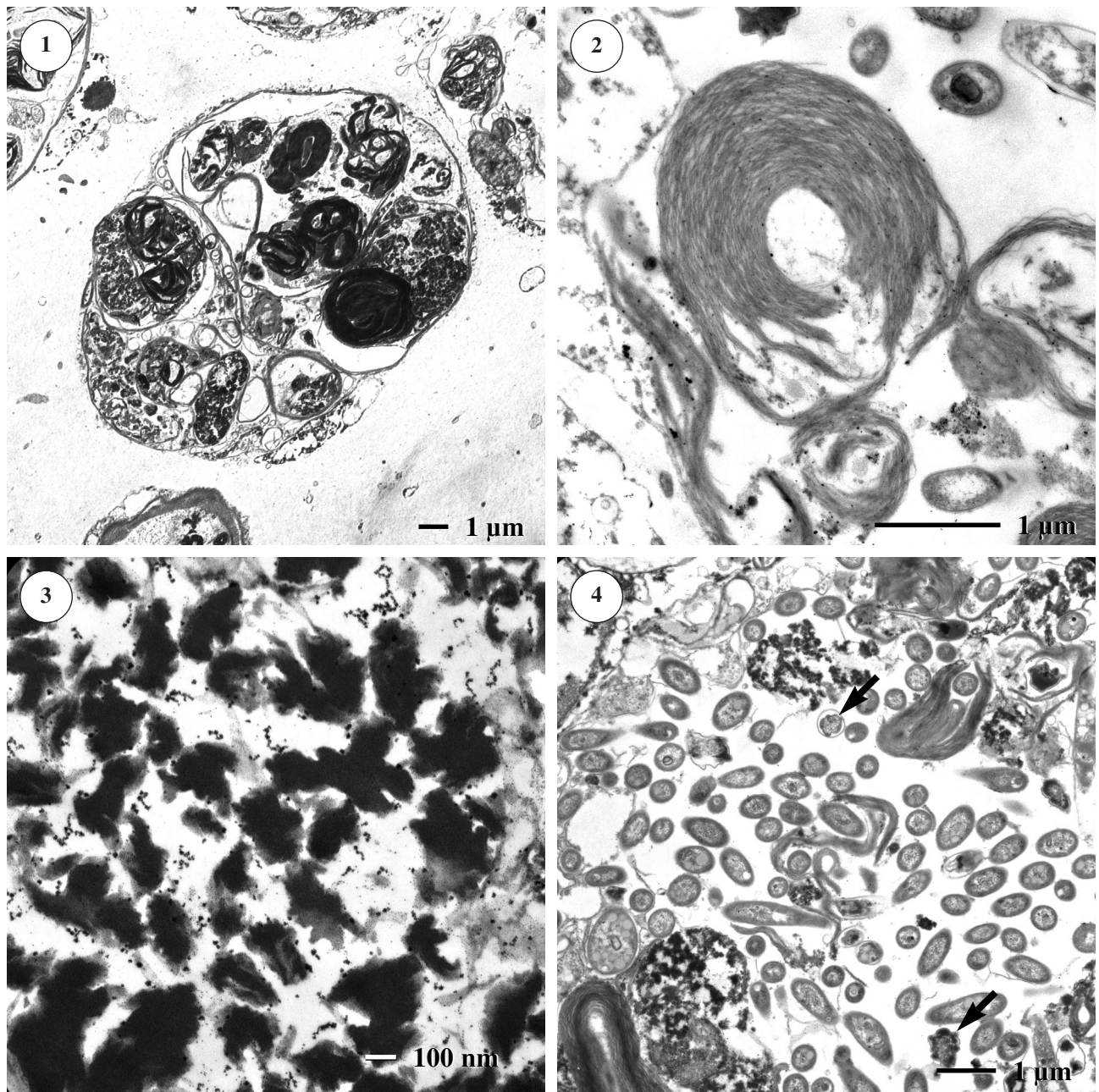
- kompartimentierte Zellen mit großen myelinartigen Membranstapeln, granulärem Material und wenigen Bakterienzellen
- kompartimentierte Zellen mit mehreren Bakterienzellen, wenigen Membranresten und etwas granulärem Material, hier sind neben intakten Bakterienzellen auch gelegentlich Verdauungsstadien von Bakterien zu finden.
- kompartimentierte Zellen, die fast ausschließlich intakte Bakterienzellen enthalten.



**Tafel 49****Kompartimentierte Zellen (LM, DIC)**

1. Übersichtsaufnahme einer Gruppe von kompartimentierten Zellen in den substratnahen Tunikaschichten (Paraffinschnitt, Färbung: Toluidinblau).
2. Kompartimentierte Zellen erscheinen im Frischmaterial gelblich bis braun (Handschnitt, ungefärbt).
3. Kompartimentierte Zellen nach Hämaalaunfärbung (nach MAYER; Paraffinschnitt). Die Zellkerne (N) können mit Hämaalaun selektiv angefärbt werden.
4. Kompartimentierte Zellen nach Durchführung der PAS-Reaktion. Die Zellen färben sich intensiv rot (Paraffinschnitt).



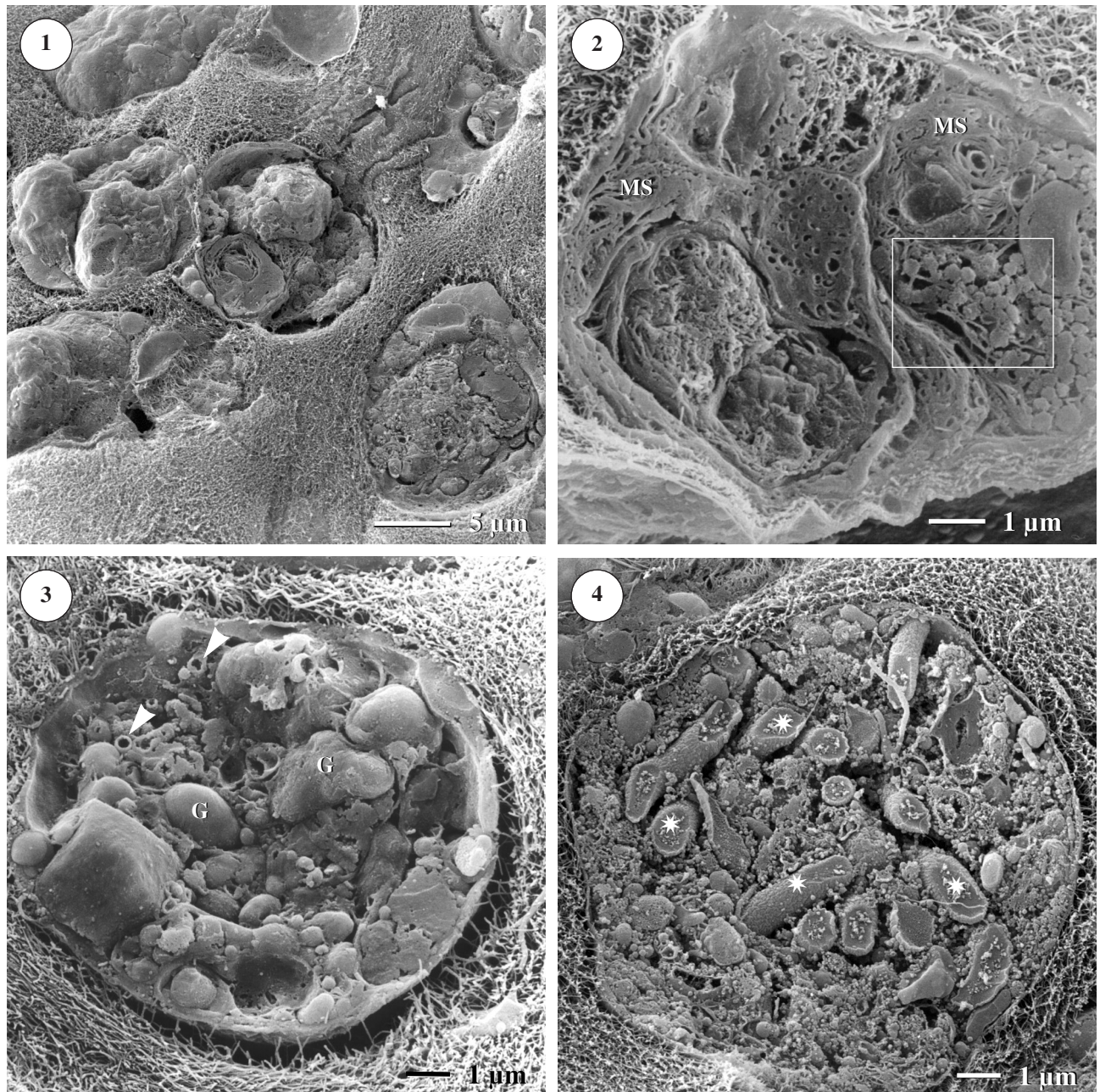


### Tafel 50

#### Kompartimentierte Zellen (TEM)

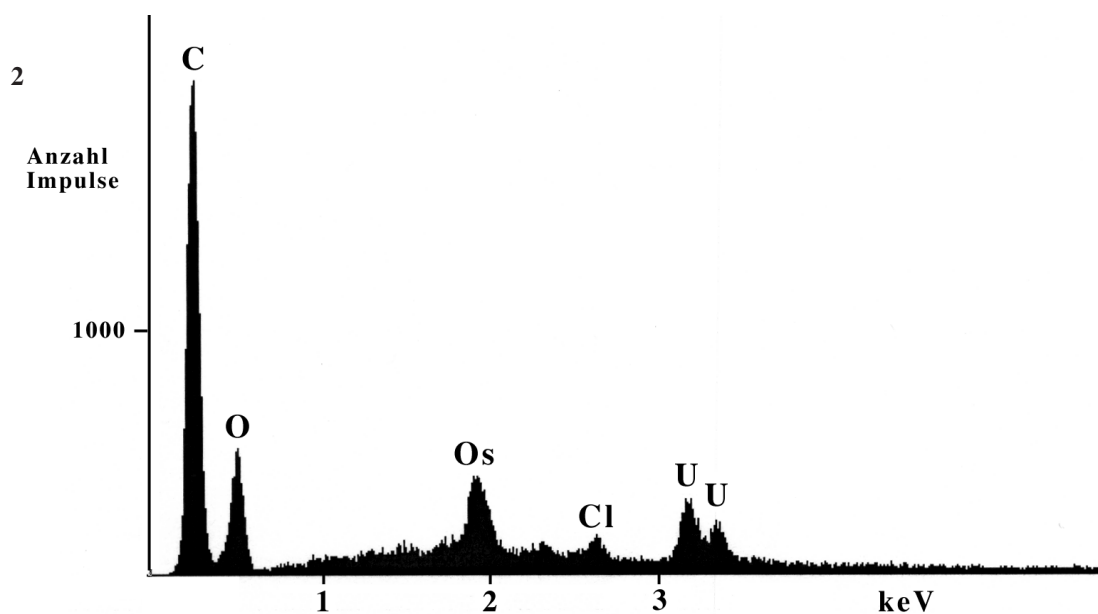
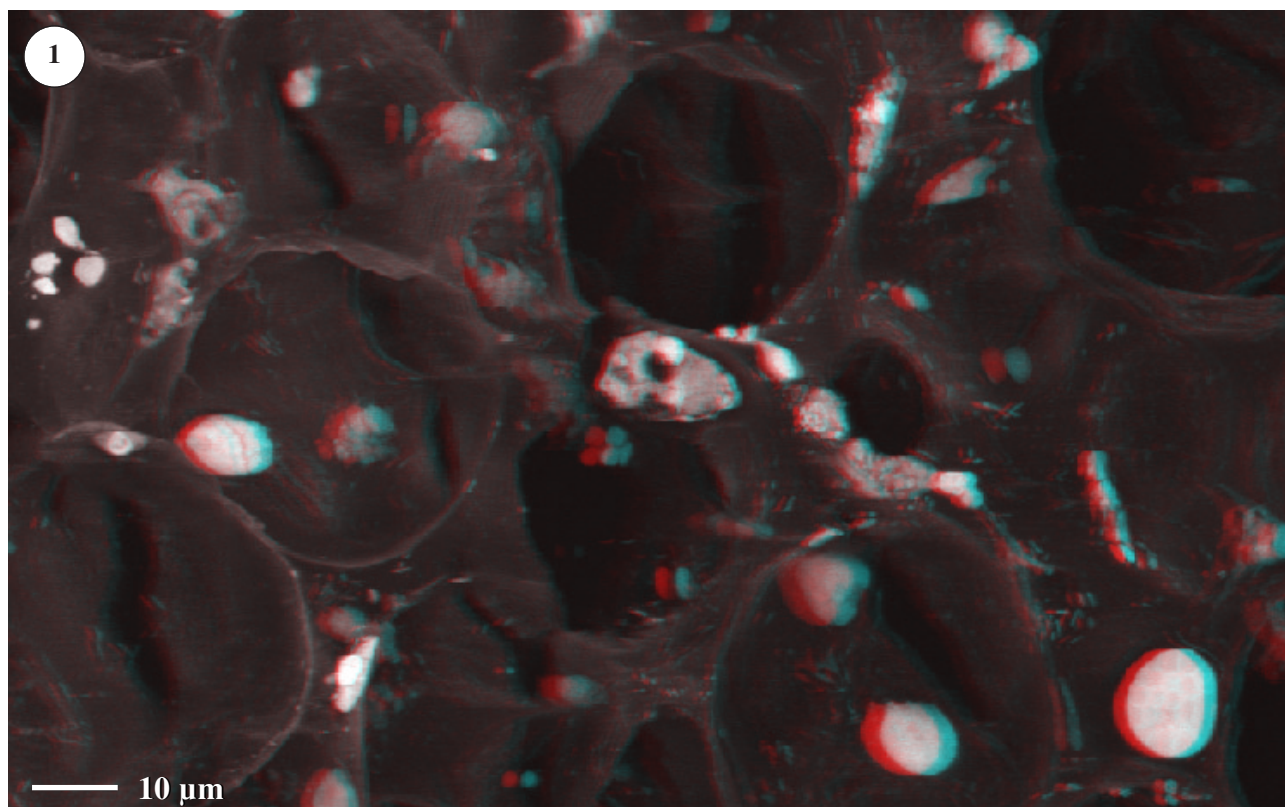
1. Übersichtsaufnahme einer kompartimentierten Zelle. In der Zelle sind große »Membranrollen« mit welliger Schichtung erkennbar.
2. Detailaufnahme eines Membranstapels in einer kompartimentierten Zelle. Die Schichtung der Membranen ist unregelmäßig und wellig.
3. Detailaufnahme von elektronendichten Granula mit »ausgezackter« Form im Cytoplasma einer kompartimentierten Zelle.
4. Kompartimentierte Zelle mit strukturell einheitlichen Bakterienzellen in hoher Dichte. Die meisten Bakterienzellen sind nach strukturellen Kriterien intakt, nur wenige Bakterienzellen werden offensichtlich von der kompartimentierten Zelle abgebaut (Pfeile).



**Tafel 51**

Kompartimentierte Zellen (REM, Kryobrüche nach TANAKA)

1. Übersichtsaufnahme einer Gruppe von kompartimentierten Zellen. Die Zellen sind in die Tunikamatrix eingebettet. Die Fasermatrix liegt den Zellen dicht an.
2. Kompartimentierte Zelle mit Membranstapeln (MS) und unregelmäßig geformten Granula (Rahmen).
3. Kompartimentierte Zelle. Die einzelnen Kompartimente haben unterschiedliche Größen und Formen. Im Cytoplasma liegen Vesikel (Pfeilspitzen) und verschieden große Granula.
4. Kompartimentierte Zelle mit zahlreichen stäbchenförmigen Bakterienzellen (Sterne).

**Tafel 52****Kompartimentierte Zellen**

1. 3D-Aufnahme (KLSM) von Tunikazellen. In der Mitte des Bildes ist eine kompartimentierte Zelle mit verschiedenen Granula zu sehen (Bitte Rot-Blau-Brille verwenden; s. letzte Seite).
2. EDX-Spektrum einer kompartimentierten Zelle. Die Probe wurde mit Osmiumtetroxid und Uranylacetat behandelt. Beide Elemente binden an Zellstrukturen der kompartimentierten Zelle und sind mit Hilfe der Elementanalyse in Semidünnschnitten durch die Zelle detektierbar. Durch gebundene Schwemetallionen erscheinen viele Zellbestandteile der kompartimentierten Zellen im TEM an Ultradünnschnitten sehr elektronendicht.



### **Inhalt der kompartimentierten Zellen**

Kompartimentierte Zellen reagierten mit den meisten der angebotenen Farbstoffe (Beispiele s. Tafel 49). Allerdings ist die Färbbarkeit unterschiedlicher Kompartimente innerhalb einer Zelle häufig verschieden. Besonders deutlich wird dies bei der Reaktion mit Osmiumtetroxid, Ölrot, Lyso Sensor Blue DND-167 und mit Eosin: Einige Vesikel werden kräftig angefärbt, andere hingegen bleiben ungefärbt. Mit Alcianblau bei pH 1 gelang keine Anfärbung der kompartimentierten Zellen. Der Kern der kompartimentierten Zellen lässt sich mit Hämalaun blau färben. In mit Osmiumtetroxid und Uranylacetat behandelten kompartimentierten Zellen lassen sich beide Schwermetalle durch EDX-Analyse nachweisen (Tafel 52, Abb. 2).

Bei Anregung mit UV-Licht (365 nm) zeigten die im Hellfeld gelblichen Kompartimente der kompartimentierten Zellen grüngelbe bis gelborange Fluoreszenz, bei Blaugrünanregung (485 nm) fluoreszierten sie schwach grün und bei Grünanregung (546 nm) kräftig rot. Die im Hellfeld dunkelbraun erscheinenden Kompartimente fluoreszierten bei keiner Anregungswellenlänge.

### **3.3.6 Morulazellen**

Morulazellen haben etwa einen Durchmesser von 15 µm und sind kugel- bis eiförmig. Sie enthalten etwa 15 bis 20 große Granula (Ø 3–4 µm), der Zellkern hat einen Durchmesser von etwa 5 µm (Tafel 53). Der Zellumriss passt sich den in der Zelle liegenden Granula an und erscheint dementsprechend maulbeerförmig. Dies lässt sich sowohl mit Hilfe des DIC als auch im KLSM und REM nachweisen (Tafeln 53, 54, 55).

Im TEM erscheinen die Granula der Morulazellen als membranumgrenzte, homogen mittel- bis dunkelgrau gefärbte Kompartimente (Tafel 53). Die einzelnen Granula sind nicht kugelförmig, sondern durch den gegenseitigen Druck meist ovoid bis polygonal, ebenso der Zellkern. Es konnte nicht eindeutig festgestellt werden, ob die Granula von einer halben, oder einer ganzen Elementarmembran begrenzt werden (Tafel 53, Abb. 4). Die zwischen den Granula liegenden Cytoplasmabereiche sind sehr schmal, die Zellen werden von den Granula und dem Zellkern fast vollständig ausgefüllt.

Nach konventioneller Fixierung erscheinen Morulazellen häufig geschrumpft und lösen sich von ihrer faserigen Umgebung (Tafel 53, Abb. 3; Tafel 54, Abb. 1). Die Plasmamembran liegt eng an den Begrenzungsmembranen der einzelnen Granula an. Im Kryo-REM wird jedoch ersichtlich, dass die voll hydratisierten Zellen an allen Seiten dicht von der Fasermatrix umschlossen werden.

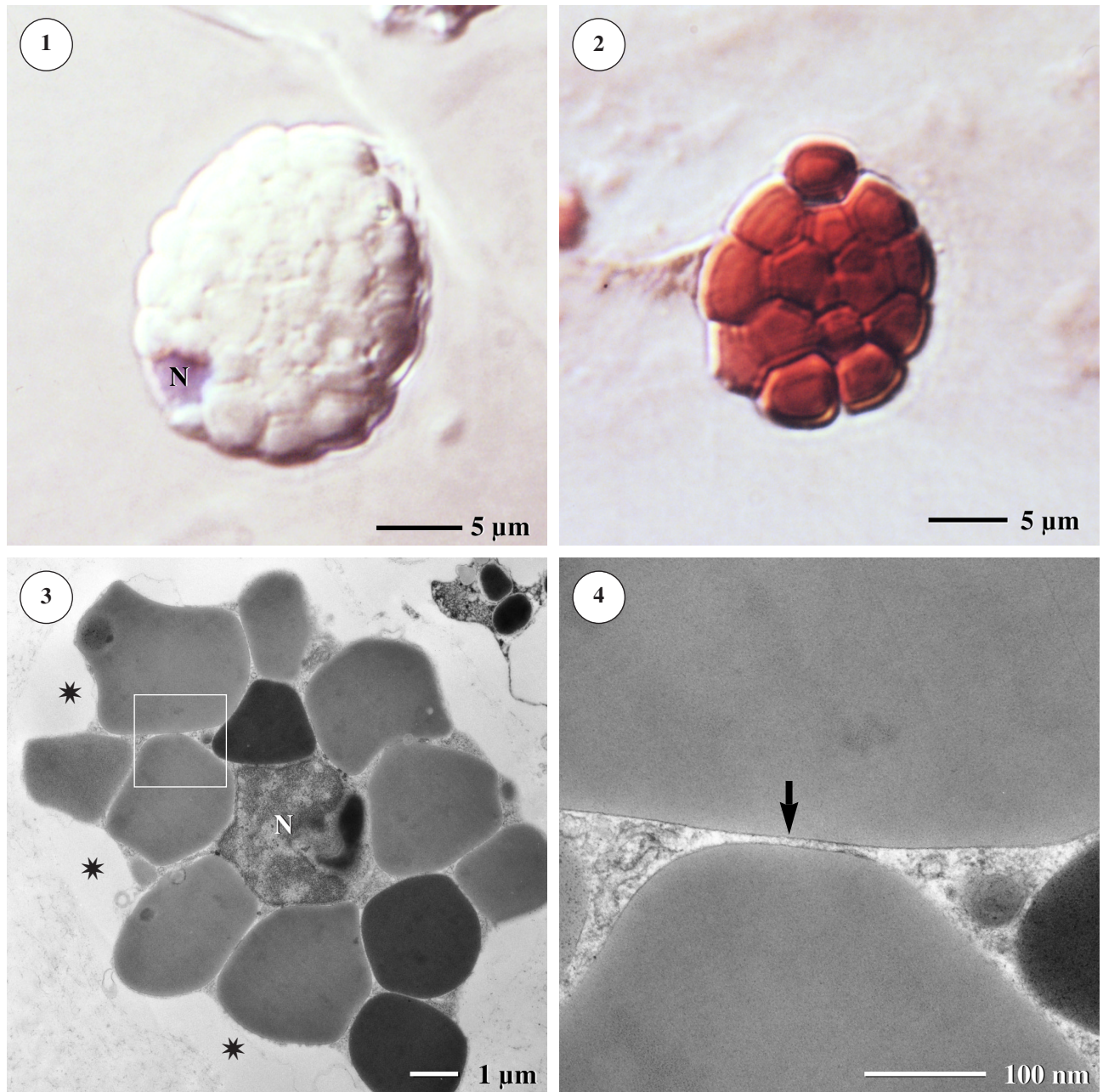


**Inhalt der Morulazellen**

Die Morulazellen ließen sich stets mit Osmiumtetroxid und Eosin (Tafel 53, Abb. 2) färben. Nach Behandlung mit SCHIFF'schem Reagenz. bzw. in der PAS-Reaktion erschienen die meisten Morulazellen schwach rosa. Morulazellen zeigen keine Reaktion mit Alcianblau, Ölrot O oder Lyso Sensor Blue DND-167.

Die Autofluoreszenz der Morulazellen ist relativ stark: Im UV-Licht (Anregungswellenlänge 365 nm) fluoreszieren sie sehr hell gelb, im blaugrünen Licht (485 nm) schwach grün und im Grünlicht (546 nm) kräftig rot. Deutlich erkennbar ist die Autofluoreszenz im KLSM (Tafel 55).

Die Elementanalyse (EDX) von Morulazellen in Kryoproben zeigt außer Kohlenstoff und Sauerstoff nur Natrium und Chlor (vermutlich aus Meerwasser). Metalle wie Eisen oder Vanadium, die in Morulazellen anderer Tunikatenarten häufig nachweisbar sind (s. Einleitung), konnten in Morulazellen von *C. dellechiaiei* nicht detektiert werden (Tafel 55, Abb. 2).

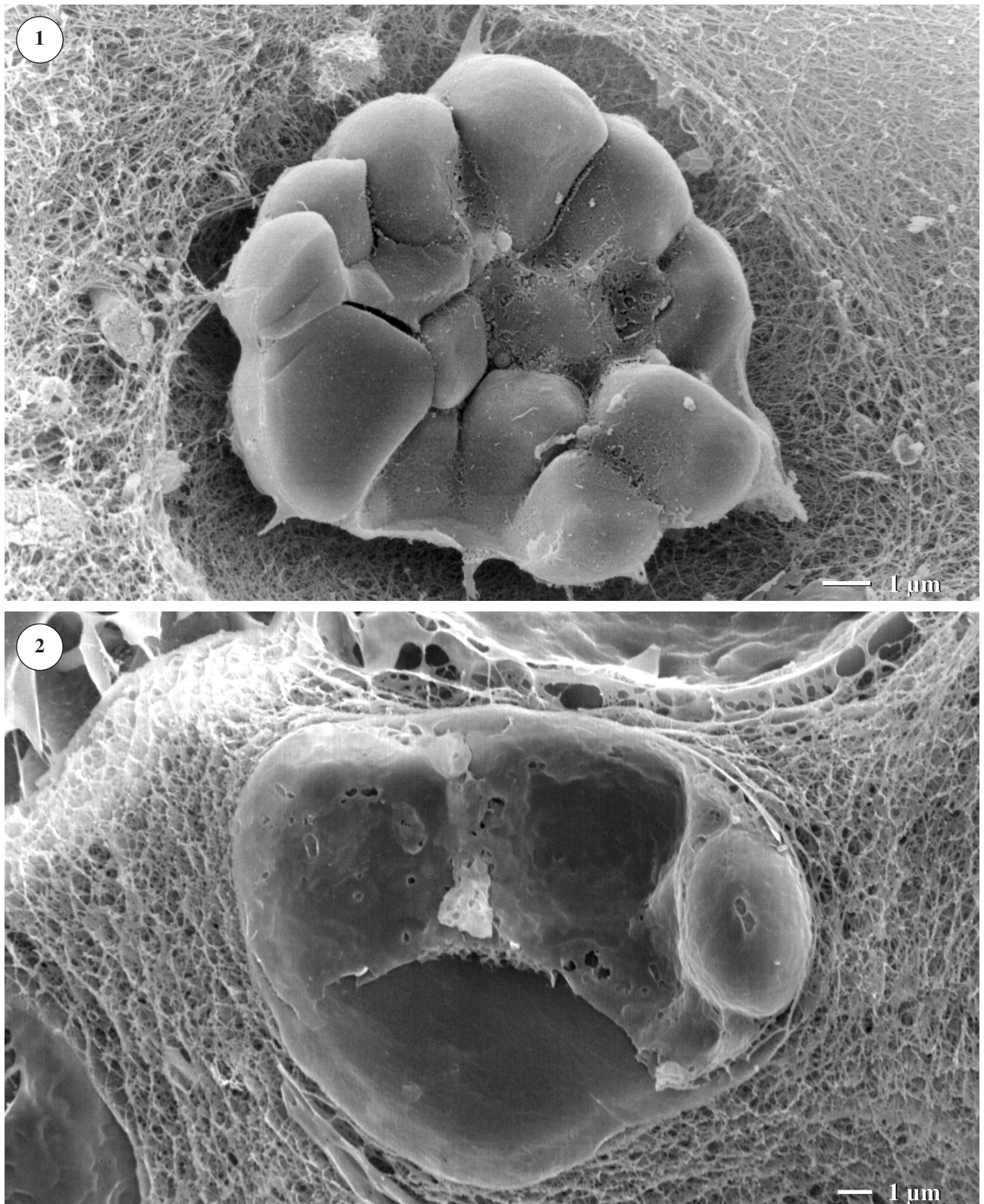


### Tafel 53

#### Morulazellen

1. Morulazelle mit zahlreichen farblosen Kompartimenten. Der Zellkern (N) wurde mit Hämalaun blau gefärbt (DIC, Paraffinschnitt, Färbung: Hämalaun nach MAYER).
2. Morulazelle nach Behandlung mit Eosin (DIC, Paraffinschnitt). Die Granula färben sich intensiv rot.
3. TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch eine Morulazelle. Die Zelle ist geschrumpft (Fixierungsartefakt) und hat sich an manchen Stellen von der umgebenden Fasermatrix gelöst (Sterne). Der Zellkern (N) ist in der Zellmitte zu erkennen. Die homogen kontrastierten Granula erscheinen unterschiedlich elektronendicht. Der eingezeichnete Rahmen zeigt die Lage des Bildausschnitts von Abb. 4.
4. Detailaufnahme der Morulazelle aus Abb. 3. Bei höherer Vergrößerung ist eine dunkel erscheinende, ca. 3 - 5 nm dicke Linie um die einzelnen Granula der Morulazellen zu erkennen (Pfeil).



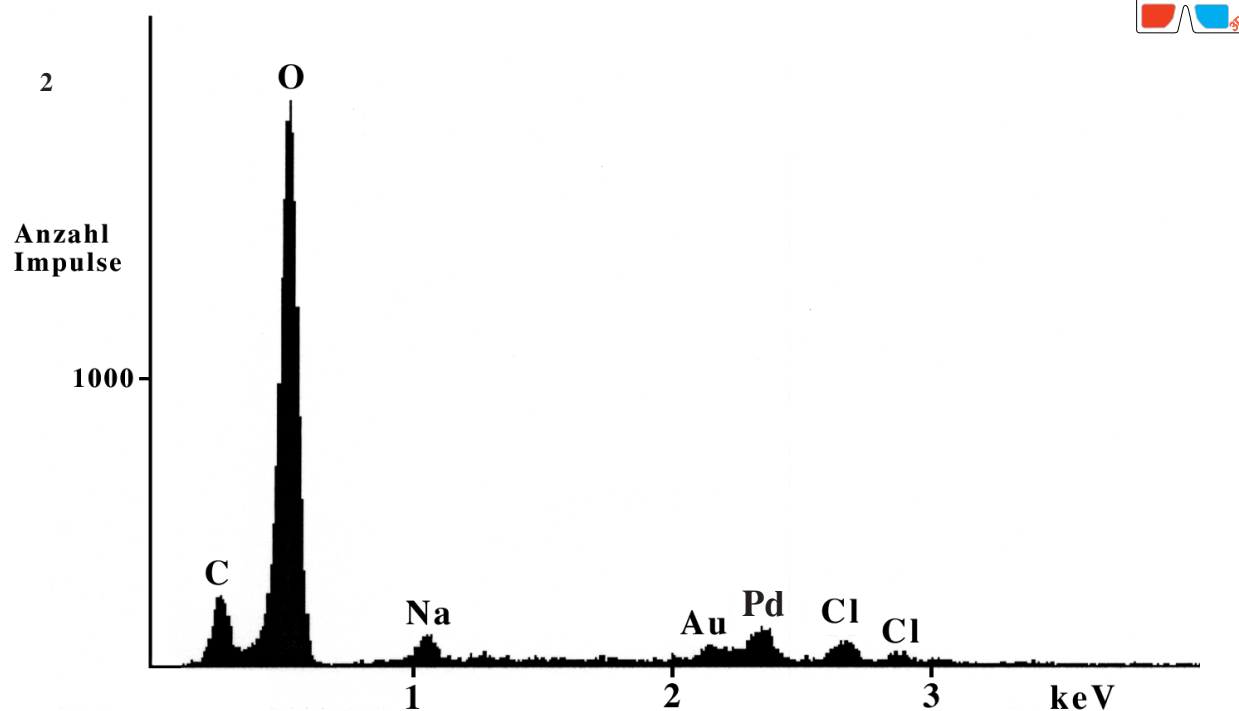
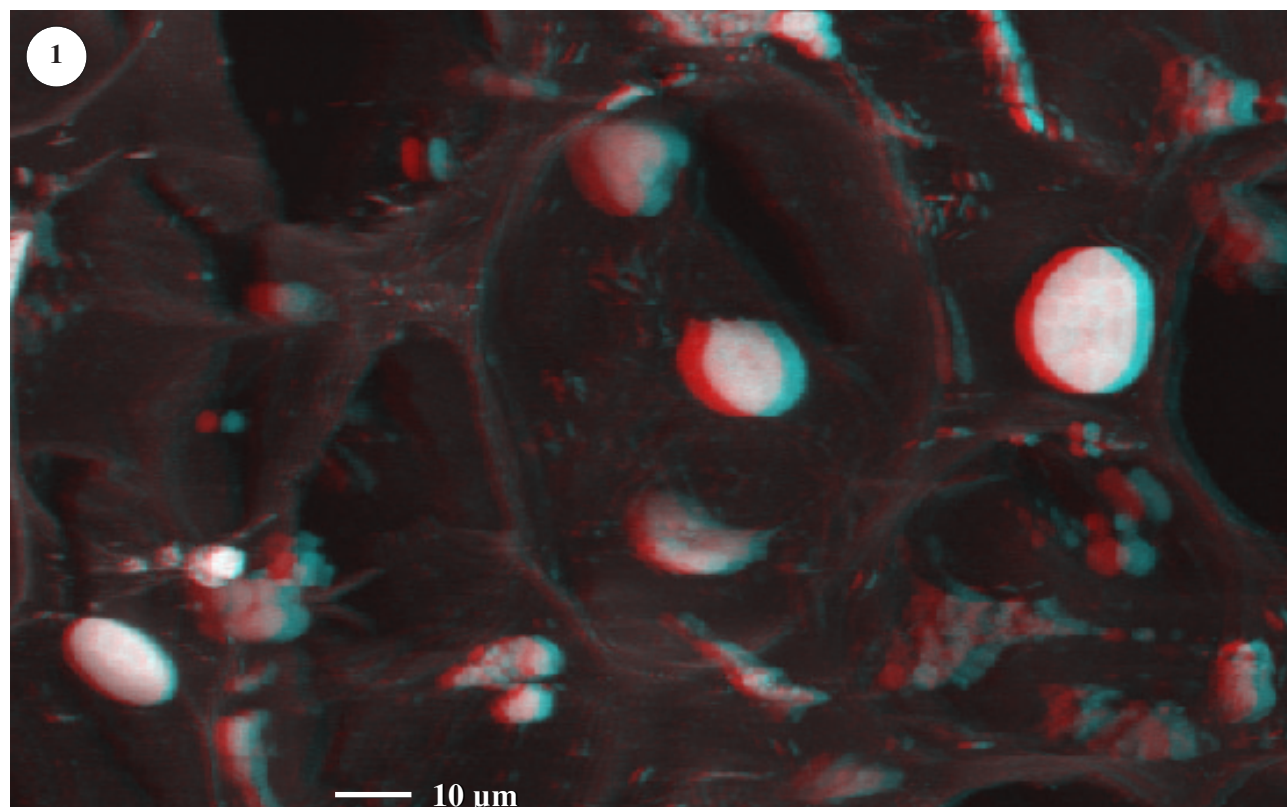


#### Tafel 54

Morulazellen (REM).

1. Morulazelle mit mehreren großen Granula. Die Zelle ist geschrumpft (Fixierungsartefakt). Kryobruch nach TANAKA.
2. Morulazelle (Kryo-REM). Die Zelle liegt der Tunikamatrix dicht an und ist nicht geschrumpft.





### Tafel 55

#### Morulazellen

1. 3D-Aufnahme (KLSM) eines Paraffinschnittes durch die Tunika von *C. dellechiaiei*. Morulazellen zeigen intensive Autofluoreszenz (Bitte Rot-Blau-Brille verwenden, s. letzte Seite).
2. Energiedispersives Röntgenspektrum (EDX-Spektrum) einer Morulazelle im Kryo-REM. Die Zelle enthält Kohlenstoff, Sauerstoff, Natrium und Chlor, jedoch weder Eisen noch Vanadium. Das Gold-Palladium (Au-Pd) -Signal wird von der Sputterschicht der Kryoprobe verursacht.

### 3.3.7 Häufigkeit und Verteilung der Tunikazellen innerhalb der Kolonie

Die Häufigkeit und Verteilung der Tunikazelltypen innerhalb der Kolonien wurde anhand von Paraffin–Serienschnitten abgeschätzt. Es ergaben sich folgende Anteile der einzelnen Zelltypen an der Gesamtpopulation der Tunikazellen (vgl. Tafel 56, Abb. 1):

**Tabelle 10**

*Häufigkeit der Tunikazelltypen*

<b>Zelltyp:</b>	<b>Anteil an der Gesamtzahl der Tunikazellen:</b>
Blasenzellen	ca. 60 %
Pigmentzellen	ca. 15 %
filopodiale Zellen	ca. 13 %
kompartimentierte Zellen	ca. 10 %
Morulazellen	ca. 2 %

Die Verteilung der verschiedenen Tunikazellen ist inhomogen. In Paraffin–Längsschnitten durch ganze Kolonien von *C. dellechiaiei* wurden für die meisten Tunikazelltypen deutliche Verteilungsschwerpunkte nachgewiesen (Tafel 56, Abb. 2 und 3):

- **Blasenzellen**

Blasenzellen sind in allen Bereichen der Tunika sehr häufig und stellen deshalb und wegen ihres beträchtlichen Zellvolumens den dominierenden Zelltyp in der Tunika von *C. dellechiaiei* dar. Sie fehlen lediglich in der subcuticulären Tunikaschicht, in der Randschicht der Tunikakanäle und in unmittelbarer Nähe der Zooide.

- **Pigmentzellen**

Pigmentzellen sind vor allem in den oberen Tunikaschichten (Schichten oberhalb der Zooidkapseln) sehr häufig. Die Häufigkeit nimmt zur substratzugewandten Seite der Kolonien hin ab. Verteilungsschwerpunkte sind außerdem bei ganz frisch gesammelten Kolonien um die Tunikakanäle herum zu erkennen.

- **Filopodiale Zellen**

Filopodiale Zellen sind in allen Tunikabereichen häufig. Besonders viele, netzwerkartig angeordnete filopodiale Zellen finden sich in der äußersten Tunikaschicht direkt unterhalb der Cuticula, sowie im Bereich der Zooidkapsel zwischen den Kalkschuppen. Im REM zeigt sich, daß hier sehr viele filopodiale Zellen frei auf der Innenwand des Zooidhohlraums liegen, beziehungsweise nur durch eine dünne Schicht Fasermatrix vom Zooidhohlraum getrennt sind. Häufig sind filopodiale Zellen in unmittelbarer Nähe von Blasen– oder Pigmentzellen zu finden.

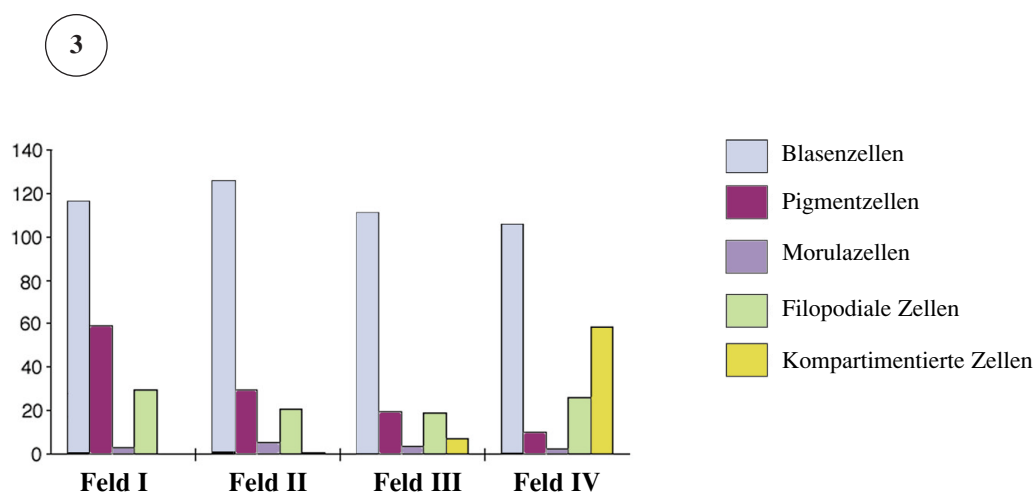
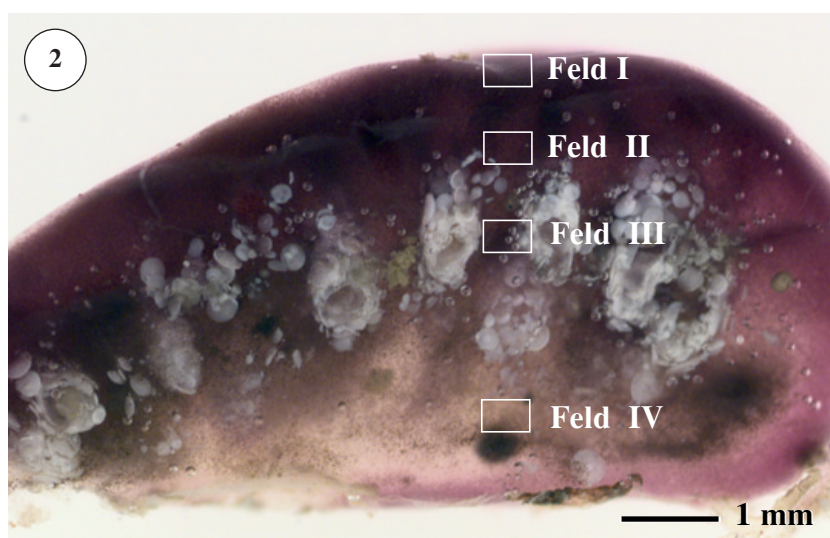
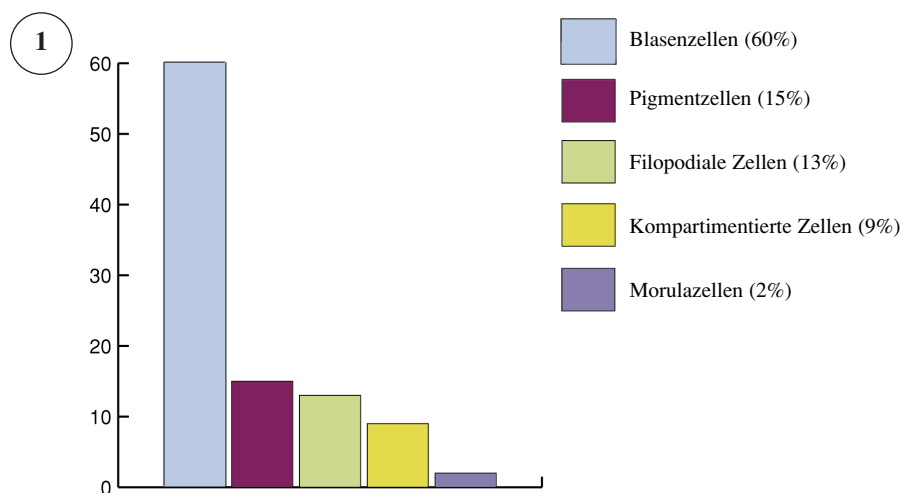
- **Kompartimentierte Zellen**

Kompartimentierte Zellen sind auf bestimmte Bereiche zwischen und unterhalb der Zooidkapseln beschränkt. Hier, in den basalen Tunikaschichten, bilden sie Gruppen von ca. 5–50 Einzelzellen, die bereits mit bloßem Auge nach Aufschneiden der Kolonien als braune „Flecken“ erkennbar sind. In den oberen Tunikaschichten kommen kompartimentierte Zellen nicht vor.

- **Morulazellen**

Morulazellen sind im Verhältnis zu den anderen Tunika–Zelltypen selten. Sie sind homogen in der Tunika verteilt. Regelmäßig bilden sie einen Teil der hauptsächlich aus kompartimentierten Zellen zusammengesetzten, braunen Zell-„*cluster*“ in den substratnahen Tunikabereichen. Auch in den zellhaltigen Bereichen der Abschlußschichten der Tunika kommen Morulazellen etwas häufiger vor.





### Tafel 56

#### Häufigkeit und Verteilung der Tunikazellen

1. Prozent-Anteile der verschiedenen Zelltypen an der Gesamtzahl der Tunikazellen.
2. Lage der Zählfelder für die Abschätzung der Zellverteilung. Feld I: Kolonieoberfläche, Feld II: Schicht oberhalb der Zooide, Feld III: Bereich zwischen den Zooiden, Feld IV: basale Tunikaschichten.
3. Häufigkeit der verschiedenen Tunika-Zelltypen in den vier Tunikabereichen.

### 3.4 Bakterien in der Tunika von *C. dellechiaiei*

In der Tunikamatrix von *C. dellechiaiei* sind bereits lichtmikroskopisch zahlreiche stäbchenförmige Bakterienzellen sichtbar. Eine genauere Charakterisierung erfolgte durch TEM- und REM-Untersuchung von Tunikaproben. Obwohl in den Tuniken beider Farbvarianten von *C. dellechiaiei* Bakterienzellen vorgefunden wurden, konnten nur die Bakterien in den Geweben violetter Kolonien genauer charakterisiert werden, da von den grünen Kolonien zu wenige Gewebeproben zur Verfügung standen. Parallel zu Bakterien in Tunikaproben wurden drei verschiedene Bakterienarten im TEM und REM untersucht, die aus frischen, violetten Kolonien von *C. dellechiaiei* isoliert und kultiviert werden konnten.

#### 3.4.1 Verteilung der Bakterien in der Tunika

In gefärbten Paraffinschnitten, aber auch in Hand- oder Gefrierschnitten unfixierten Materials sind an manchen Stellen in der Tunikamatrix (z.B. unterhalb der Abschlußschichten, im Bereich der Zooidkapsel) Bakterien in großer Dichte nachweisbar. In den übrigen Bereichen der Tunika sind die Matrixbrücken zwischen den Tunikazellen sehr schmal (s. z.B. Tafel 16, Abb. 4) und beherbergen keine ausgedehnten Bakterienaggregate. Trotzdem lassen sich auch im Inneren der Tunika aller untersuchter Kolonien verstreute Bakterienzellen und kleinere Bakterienanhäufungen beobachten. Im Unterschied zum teilweise sehr artenreichen Aufwuchs auf der Kolonieaußenseite sind die Bakterienzellen im Inneren der Kolonie wenigen Typen zuzuordnen (Tafel 15, Abb. 4; Tafel 57 und 58). Algen und Cyanobakterien kommen nur im Aufwuchs bzw. im Bereich der Cuticula, nicht aber in der Tunikamatrix vor (vgl. Tafel 15).

#### 3.4.2 Bakterientypen im Tunikagewebe

Eine genauere Charakterisierung der Bakterienzellen im Tunikagewebe erfolgte mittels TEM und REM. Im TEM ist die ultrastrukturelle Unterscheidung von Gram-positiven / Gram-negativen Bakterien anhand des Aufbaus ihrer Zellhülle möglich. Im REM nach konventioneller Präparation können zusätzlich äußerliche Merkmale der Mikroorganismen (Zellform, -größe, -oberfläche, Besitz und Lage von Flagellen) untersucht werden. Im Folgenden werden zunächst im TEM ersichtliche strukturelle Eigenschaften der Bakterienzellen, dann im REM anhand ihrer Oberflächenmerkmale unterschiedene Bakterientypen beschrieben.

#### Bakterientypen in Ultradünnschnitten (TEM)

In Ultradünnschnitten des Tunikagewebes lassen sich mindestens drei verschiedene Bakterientypen unterscheiden:

- **Typ A** (Tafel 57, Abb. 1–4)  
Bakterien des Typs A sind (nach ultrastrukturellen Kriterien) Gram-positiv, stäbchenförmige Bakterien mit relativ glatter Zelloberfläche. Die Zellen sind etwa 3–4 µm lang, der Zelldurchmesser beträgt meist etwa 0,5 µm, gelegentlich werden Zelldurchmesser von 0,9 µm erreicht. Im Inneren der Zellen finden sich zahlreiche, große (Ø 80–100 nm), mäßig elektronendichte, homogene Granula (Tafel 57, Abb. 4;

möglicherweise aus Poly- $\beta$ -Hydroxybuttersäure). Daneben enthalten die Zellen des Typs A regelmäßig mehrschichtige, zentral im Bereich des Nukleoids gelegene Membranstapel und dunkle, aus sehr kleinen Granula und Fibrillen zusammengesetzte kugelförmige Ballen (Tafel 57, Abb. 3). Typ A-Zellen kommen in sehr großen Dichten (bis ca.  $10^{11}$  Zellen/ml) in kompartmentierten Zellen vor (Tafel 54, Abb. 1). Vereinzelt werden sie auch von filopodialen Zellen aus der Tunikamatrix aufgenommen. Die meisten in der Tunika von *C. dellechiaiei* vorgefundenen Bakterienzellen gehören zum Typ A.

- **Typ B** (Tafel 58, Abb. 1–4)

Ein zweiter Typ stäbchenförmiger Bakterienzellen (= Typ B) kann in der Tunikamatrix von *C. dellechiaiei* nachgewiesen werden. Die Zellen besitzen eine innere und eine äußere Membran und dazwischen eine dünne, mäßig elektronendichte Peptidoglykanschicht. Sie können daher nach ultrastrukturellen Gesichtspunkten den Gram-negativen Bakterien zugeordnet werden. Die Zellen haben etwa einen Durchmesser von 0,5  $\mu\text{m}$ . Die Zelloberfläche erscheint im TEM glatt bis leicht gewellt. Bei vielen Zellen läßt sich eine dünne Schleimhülle auf der Oberfläche beobachten. Manche Zellen des B-Typs enthalten sehr elektronendichte Einschlüsse, die sich häufig peripher in der Nähe der Plasmamembran befinden (Tafel 58, Abb. 1, 2). Besonders deutlich ist bei Typ B-Zellen der große zentrale Nucleoidbereich mit faserigem DNA-Material vom relativ schmalen peripheren Ring aus ribosomenreichem, elektronendichterem Cytoplasma zu unterscheiden (Tafel 58, Abb. 1). Die Peptidoglykanschicht ist bei den meisten Zellen kaum erkennbar; bei manchen Zellen ist der periplasmatische Raum etwas aufgeweitet. Gelegentlich lassen sich Zellen mit Typ B-Merkmalen beobachten, die eine sehr ungewöhnliche Zellform haben: Die Zellen sind etwa Y-förmig verzweigt, in allen drei „Armen“ lassen sich Nucleoidbereich, ribosomenhaltiges, peripheres Cytoplasma und Zellhülle unterscheiden (Tafel 58, Abb. 2).

Typ B-Zellen liegen häufig frei in der Tunikamatrix, sind aber fast immer in unmittelbarer Nähe zu filopodialen Zellen zu finden, von denen sie in großer Zahl phagocytiert werden (Tafel 58, Abb. 3 und 4).

- **Typ C** (Tafel 58, Abb. 5–6)

Beim dritten Bakterientyp (= Typ C) in *C. dellechiaiei* handelt es sich ebenfalls um stäbchenförmige Zellen (Länge ca. 3–4  $\mu\text{m}$ , Durchmesser ca. 0,3–0,5  $\mu\text{m}$ ). Wie die Zellen von Typ B besitzen sie Strukturmerkmale Gram-negativer Bakterien (innere und äußere Membran, dünne Peptidoglykanschicht). Die Zelloberfläche dieses Typs ist jedoch nicht glatt, sondern bildet zahlreiche, faltenförmig erscheinende Protrusionen (Tafel 58, Abb. 5). Typ C-Zellen wurden vor allem einzeln in tieferen Schichten der Tunikamatrix (zwischen „clusters“ von kompartmentierten Zellen) gefunden. Nur gelegentlich können auch intrazellulär (in filopodialen Zellen) Typ C-ähnliche Bakterienzellen beobachtet werden (Tafel 58, Abb. 6). Im Verhältnis zu Typ A und B sind die Typ C-Zellen sehr selten.

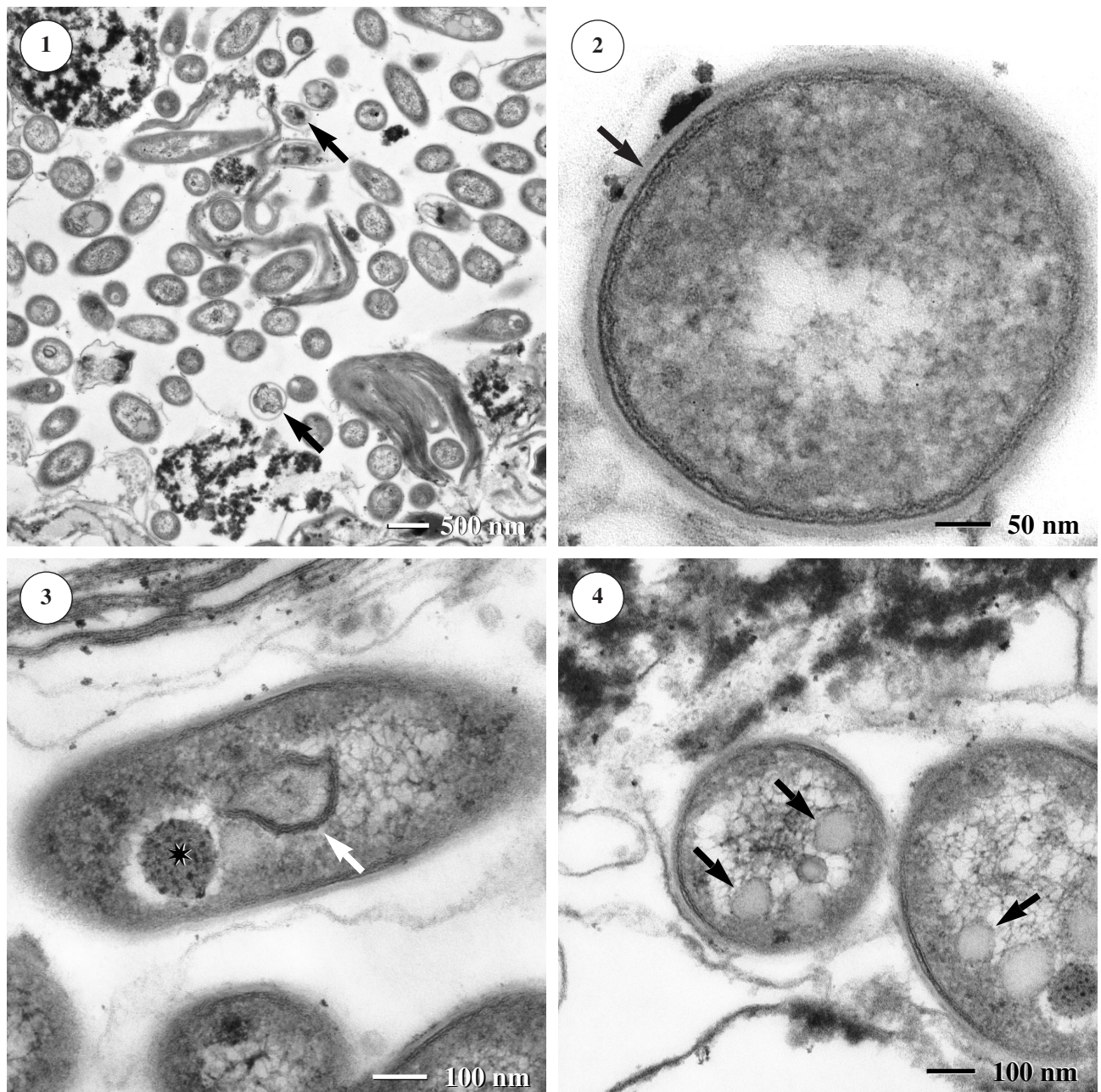


**Mikroorganismen in REM-Proben**

Anhand von Gefrierbrüchen (TANAKA-Technik) ließen sich morphologisch sehr einheitliche Bakterienzellen in großer Dichte in manchen kompartimentierten Zellen nachweisen (Tafel 51, Abb. 4). Die Bakterien sind stäbchenförmig, haben eine faltige Oberfläche, keine Flagellen und einen Durchmesser von 0,5–0,85 µm.

Auch in unmittelbarer Nähe bzw. in den filopodialen Zellen sind stäbchenförmige Bakterienzellen im REM erkennbar. Aufgrund der besseren Zugänglichkeit lassen sich allerdings vor allem die filopodialen Zellen untersuchen, die frei auf der (meerwasserumspülten) Innenseite des Zooidhohlraums liegen. Die hier vorgefundenen Bakterien sind stäbchenförmig und haben eine leicht „faltige“ Oberfläche. Gelegentlich fanden sich auf freiliegenden filopodialen Zellen auch Bakterien mit ungewöhnlicher Struktur: Stäbchenförmige Bakterienzellen, die wie zwei ineinander verdrehte Stränge geformt sind (Tafel 59, Abb. 2).

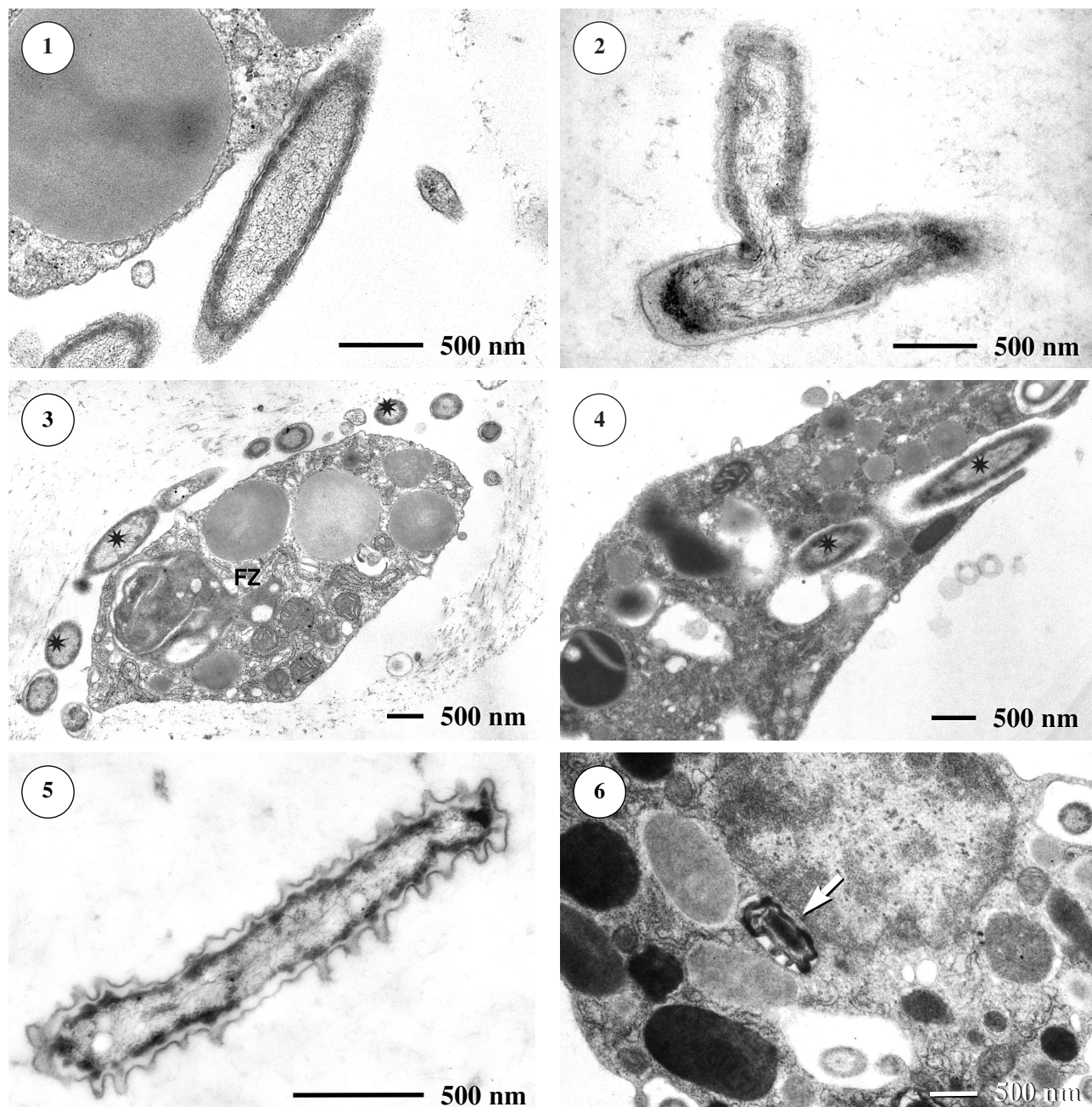
Auf der Kolonieaußenseite schließlich konnte, vor allem bei gehäuterten Kolonien, eine große Vielfalt an Mikroorganismen beobachtet werden: Bakterien mit „genoppter“ oder glatter Oberfläche, schraubenförmige Stäbchen (Tafel 59, Abb. 2), Kokken mit zahlreichen faserförmigen Fortsätzen, Diatomeen und fädige Algen liegen auf oder nahe der Kolonieoberfläche in der Tunika. Diatomeen sind häufig etwas in die Kolonieoberfläche eingesenkt.

**Tafel 57**

Bakterien in der Tunika von *C. dellechiaiei* (TEM)

1. Bakterienzellen in einer kompartimentierten Zelle. Die Bakterien sind strukturell einheitlich und größtenteils unversehrt. Wenige Bakterienzellen sind durch Verdauung angegriffen (Pfeile).
2. Bakterienzelle (= Typ A) aus einer kompartimentierten Zelle. Nach strukturellen Kriterien ist dieser Bakterientyp Gram-positiv. Die Zelle besitzt eine dicke Zellwand (Pfeil).
3. Typ A-Bakterienzelle mit Membranstapel (Pfeil) und elektronendichtem Ballen aus granulärem Material (Stern).
4. Typ-A-Bakterienzellen mit homogenen Speichergranula (vermutlich Poly- $\beta$ -Hydroxybuttersäure; Pfeile).



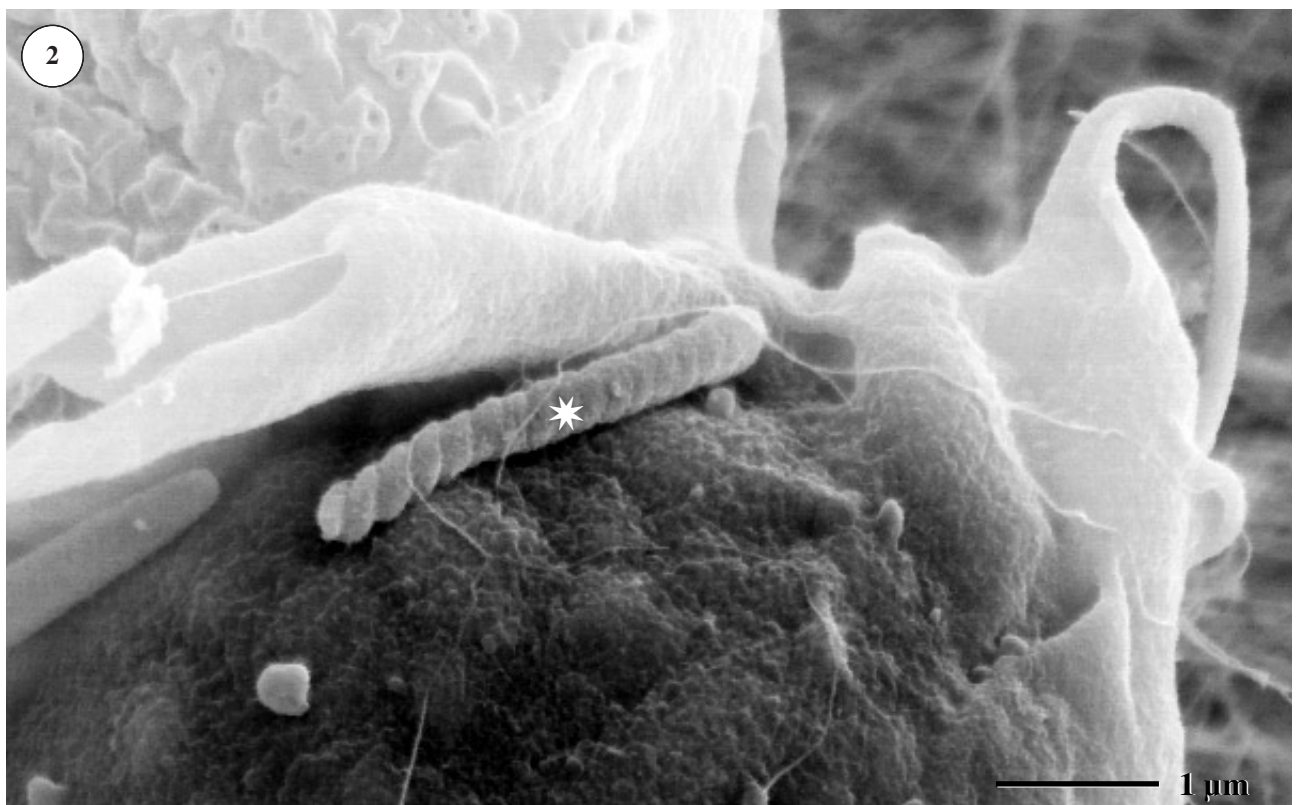
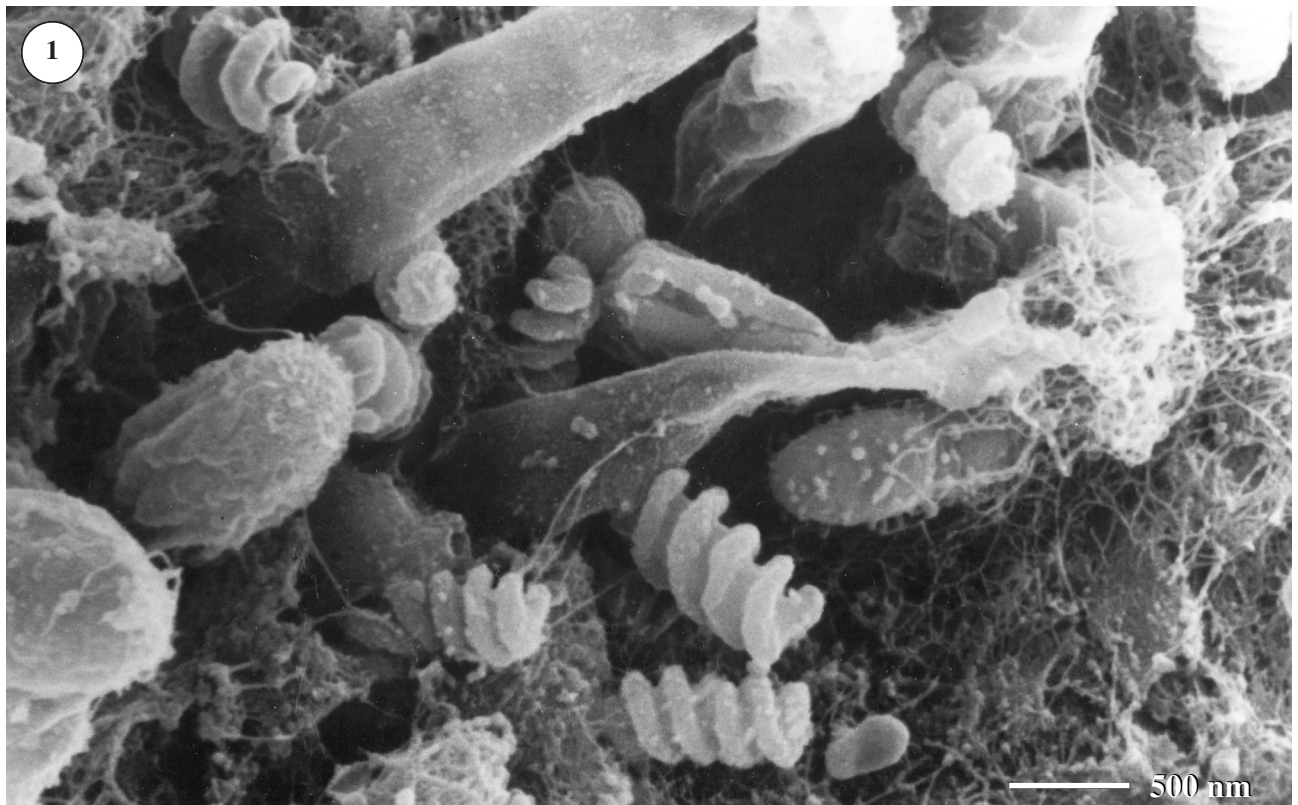


### Tafel 58

Bakterien in der Tunika von *Cystodytes dellechiaiei* (TEM).

1. Nach strukturellen Gesichtspunkten Gram-negative Zelle des Bakterientyps B.
2. Gelegentlich können verzweigte Zellen des B-Typs in der Tunikamatrix nachgewiesen werden.
3. Typ-B-Zellen (Sterne) in unmittelbarer Umgebung einer filopodialen Zelle (FZ).
4. Typ-B-Zellen (Sterne) werden von einer filopodialen Zellen phagocytiert.
5. Stäbchenförmiges Bakterium vom Typ C mit ungewöhnlichen Oberflächenprotrusionen.
6. Teilweise verdaute Bakterienzelle (Typ C?) in einer filopodialen Zelle (Pfeil; Detailvergrößerung von Tafel 44, Abb. 1)





**Tafel 59**

Bakterien in REM-Proben von *C. dellechiaiei*

1. Aufwuchs auf der meerwasserexponierten Oberfläche einer stark bewachsenen Kolonie.
2. Bakterienzelle (Stern) mit ungewöhnlicher Form auf einer filopodialen Zelle im Zooidhohlraum.

### 3.4.3 Bakterientypen der Isolate

Drei verschiedene Bakterienstämme (benannt mit 1–3), die aus violetten Kolonien von *C. dellechiaiei* isoliert und kultiviert wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit raster- und transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. Von jedem Isolat wurden Proben aus der logarithmischen Phase und aus der stationären Phase der Zellanzucht genommen. An den Isolaten wurde eine auszugsweise Sequenzierung der 16S-rRNS durchgeführt, um Hinweise auf die Verwandtschaft der Isolate mit bereits bekannten Bakterienarten zu erhalten (WIRTH, pers. Mitteilung). Alle Bakterienisolate sind Gram-negativ.

- **Isolat 1**

In der logarithmischen Phase der Kultur sind die Zellen des Isolats 1 weitgehend stäbchenförmig, mit einer Länge von maximal 4,5 µm und einem konstanten Durchmesser von 500 nm–600 nm (Tafel 60, Abb. 1). In der stationären Phase kommt es zur Ausbildung verschiedenster Zellformen: Stäbchenförmige, kugelige, keulenförmige, verzweigte und hakenförmige Zellen sind im REM erkennbar (Tafel 61, Abb. 1 und 2). Reservestoff-Granula wurden in den Zellen des Isolats 1 nicht gefunden. Der Kontrastunterschied zwischen dem zentralen Nucleoidbereich und dem peripheren ribosomenhaltigen Plasma ist bei diesen Zellen sehr deutlich (Tafel 60, Abb. 1, 2). Die Peptidoglycanschicht ist dünn und nur an wenigen Stellen sichtbar, der periplasmatische Raum ist stets sehr schmal (10–15 nm). Die Zelloberfläche ist leicht „runzelig“, die Zellen sind unbegeißelt (Tafel 61)

- 

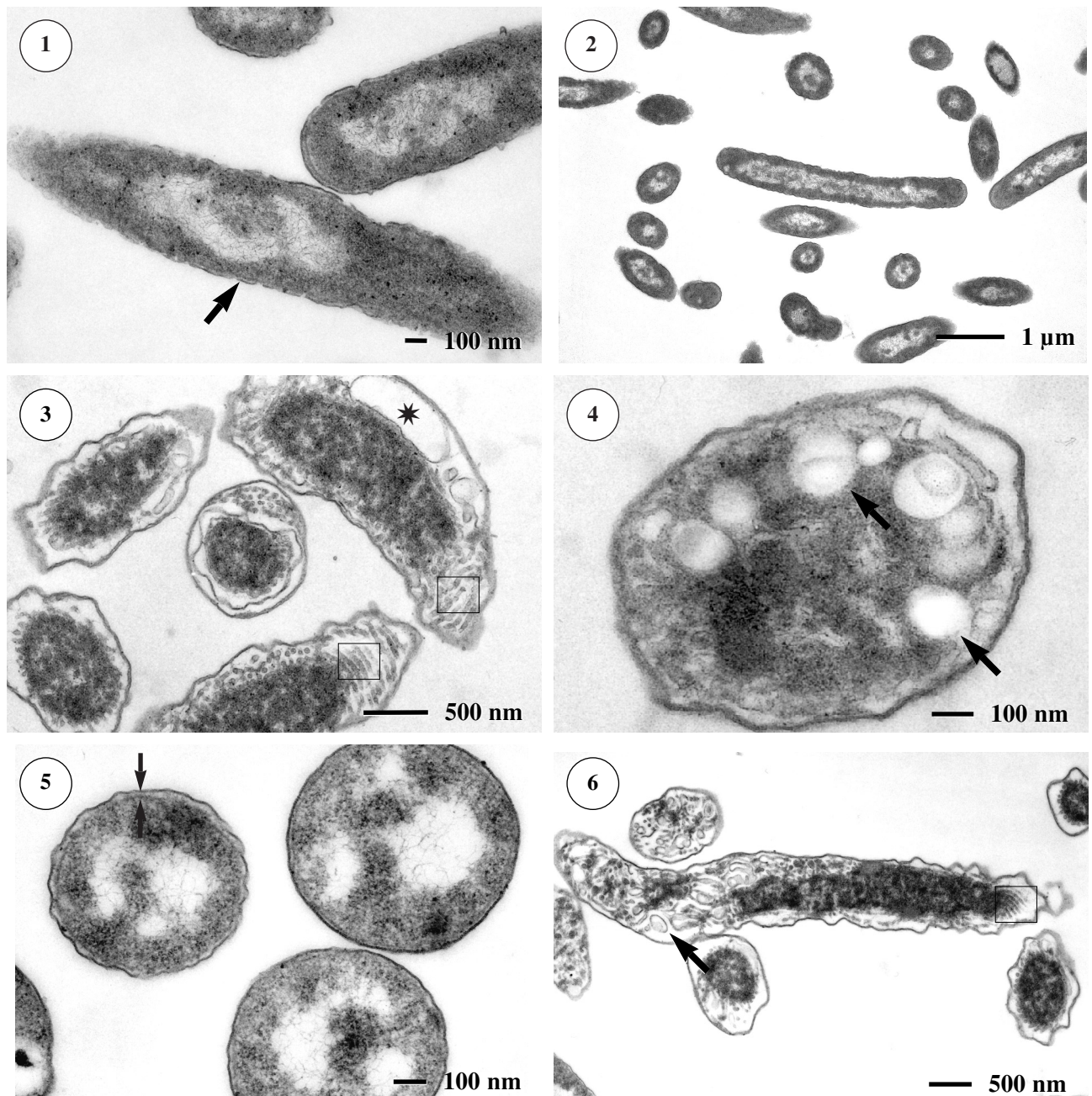
- **Isolat 2**

Bei Isolat 2 treten bereits in der logarithmischen Phase verschiedenste Zellformen auf. Die Mehrzahl der Zellen ist jedoch annähernd stäbchenförmig (Tafel 61, Abb. 3). Der periplasmatische Raum ist meist stark aufgeweitet und enthält zahlreiche tubuläre Elemente (Ø 30 nm–40 nm; Tafel 61, Abb. 3). Im Plasma der Zellen sind neben elektronendichten ribosomenhaltigen Bereichen sehr helle, elektronentransparente Vesikel sichtbar (Tafel 60, Abb. 3 und 4).

- **Isolat 3**

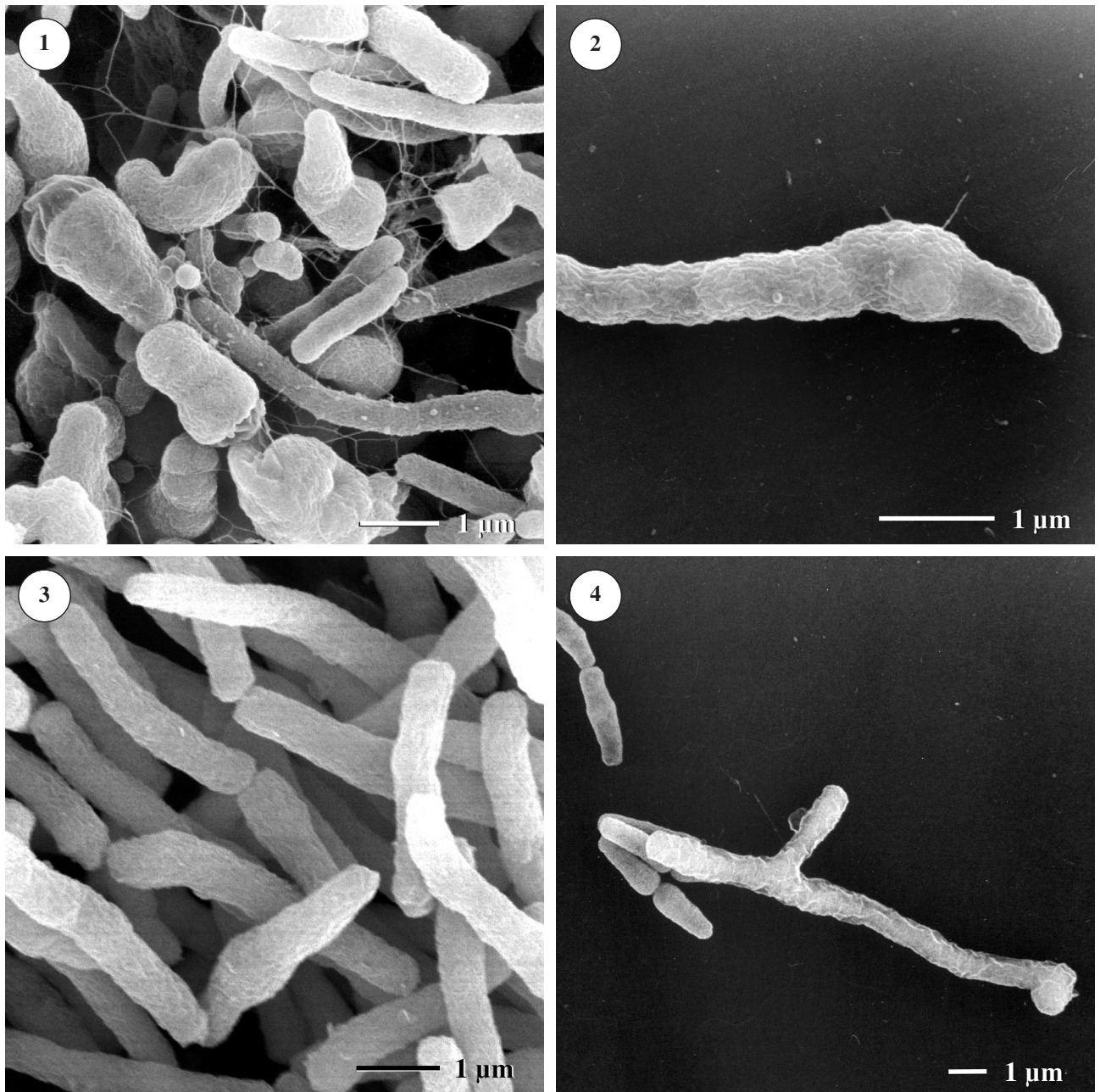
Die Zellen des Isolats 3 ähneln morphologisch sehr den Zellen des Isolats 1. Die Zellen sind sehr pleomorph. Auch bei diesem Isolat treten gelegentlich Y-förmige Zellen auf (Tafel 61, Abb. 4). Bei manchen Zellen ist der periplasmatische Raum aufgeweitet und enthält Tubuli (Ø 30 nm–40 nm; Tafel 60, Abb. 6). Geißeln sind –soweit erkennbar– nicht vorhanden.

Die Sequenzvergleiche der 16S rRNS-Analyse ergab bei Isolat 1 und Isolat 2 weniger als 90 %ige Übereinstimmungen mit bereits bekannten Arten. Die Isolate 1 und 2 gehören wahrscheinlich zur Gruppe der Proteobakterien, Isolat 3 zeigt in der 16S rRNS-Analyse 94 % Übereinstimmung mit dem cellulosespaltenden Bodenbakterium *Microbulbifer hydrolyticus* (WIRTH, pers. Mitteilung). Anschließend an die Isolierung der Bakterien wurden in der Arbeitsgruppe STEFFAN wiederum Extrakte der Bakterienproben hergestellt und im NMR auf Gehalt an Shermilamin B oder Kuanoniamin getestet. In keinem der Extrakte konnten bisher Pyridoacridinalkaloide vorgefunden werden. Die NMR-Untersuchungen an Isolat-Extrakten sind jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

**Tafel 60****Bakterienisolate (TEM)**

1. Isolat 1, logarithmische Phase. Die Zellen besitzen eine äußere und eine innere Membran und eine relativ dünne Zellwand (= strukturelle Merkmale Gram-negativer Bakterien, s. Pfeil).
2. Isolat 1, stationäre Phase. Die meisten Zellen sind stäbchenförmig.
3. Isolat 2, logarithmische Phase. Die Zellen sind pleomorph und weisen im periplasmatischen Raum Tubuli (Rahmen) und große, elektronentransparente Vesikel (Stern) auf.
4. Isolat 2, logarithmische Phase. Zelle mit elektronentransparenten Vesikeln (Pfeile).
5. Isolat 3, logarithmische Phase. Diese Zellen sind – nach strukturellen Gesichtspunkten – Gram-negativ: sie weisen eine innere und eine äußere Membran auf (Pfeile). Die Zellwand ist relativ dünn.
6. Isolat 3, logarithmische Phase. Bei diesen Zellen ist der periplasmatische Raum ebenfalls aufgeweitet und enthält Tubuli (Rahmen) und vesikuläre Elemente (Pfeil).





# **Tafel 61**

Bakterienisolate (REM)

1. Isolat 1, stationäre Phase. Die Zellen sind pleomorph.
2. Isolat 1, stationäre Phase. Zellverdickung an einer stäbchenförmigen Zelle.
3. Isolat 2, logarithmische Phase. Die meisten Zellen sind annähernd stäbchenförmig,
4. Isolat 3, logarithmische Phase. Gelegentlich treten verzweigte Zellen auf.

### 3.5 Struktur der Larven von *C. dellechiaiei*

Die Larven von *C. dellechiaiei* besitzen bereits Tunikagewebe, die sich jedoch strukturell und cytologisch von der Tunika der Kolonien unterscheiden. Um beide Tunikatypen zu vergleichen und Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Tunikazellen aufzuzeigen, wurden die Larven sowohl raster- als auch transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. Lichtmikroskopie wurde vor allem zur Lebenduntersuchung frisch entnommener Larven eingesetzt.

#### 3.5.1 Vorkommen und Aufbau der Larven

Die Larven befanden sich in Bruttaschen, die von einigen Zooiden ausgebildet worden waren; sie waren also noch nicht geschlüpft.

Die Larven von *C. dellechiaiei* haben eine Länge von ca. 2 mm. Sie sind typische kaulquappenähnliche Polycitoridenlarven (Tafel 62, Abb. 1) mit ovoidem Körper (Länge ca. 1 mm) und langem Schwanz (Länge ca. 1 mm). Der gesamte Körper ist von der Larventunika umgeben. Der Schwanz enthält die Chorda (ventral) und das Neuralrohr (dorsal), der Hauptteil des Schwanzes wird jedoch von Tunikagewebe gebildet, das als Flossensaum um das Zooidgewebe herum angelegt ist (Tafel 62, Abb. 1). Die Epidermiszellen der Larven besitzen große, kugelförmige Kerne, ausgeprägte Nucleoli, *tight junctions*, große Mengen an rauhem ER und zahlreiche Mitochondrien (Tafel 63, Abb. 3).

#### 3.5.2 Struktur der Larventunika

##### Schichtung der Larventunika

Die Tunika der Larven von *C. dellechiaiei* zeigt die bereits für mehrere andere Ascidienarten beschriebene charakteristische Schichtung (BURIGHEL und CLONEY 1997; Tafel 63, Abb. 1; vgl. Tafel 5).

Die larvale Tunika wird nach außen von der sogenannten **C1-Schicht** (äußere Cuticula) abgeschlossen, die charakteristische Ornamente besitzt (Tafel 63, Abb. 1). Im REM erscheinen die Ornamente als einzelne, gleichmäßig verteilte kleine Papillen (Ø 30–60 nm). Daneben treten auch größere, kugelige Ornamente auf (Durchmesser der Einzelkugeln 75–125 nm), die perlschnurartig aufgereiht oder zu ringförmigen Strukturen angeordnet sind. Meist begrenzen diese größeren Ornamente cuticuläre Schollen („Plaques“), die der durchgehenden Cuticula schuppenartig aufgelagert sind (Tafel 64, Abb. 1 und 2). Es kommen aber auch auf der durchgehenden Cuticulaschicht Leisten aus größeren Ornamentreihen vor. Im TEM stellt sich die C1-Schicht als mäßig elektronendichte Schicht aus feinem, fibrillärem Material dar, auf die zahlreiche, elektronendichte Ornamente aus kleinen Einzelkörnern aufgelagert sind (Tafel 63, Abb. 1). Die durchgehende fibrilläre Schicht ist 50–150 nm dick. Die aufgelagerten Körnchen haben einen Durchmesser von 40–60 nm und bilden häufig perlschnurartige Elemente.

Unterhalb der C1–Schicht ist im TEM das „*outer compartment*“ erkennbar. Es hat eine Dicke von 0,2–1 µm und enthält fibrilläres Material. Bakterien oder Tunikazellen wurden in dieser Schicht nicht nachgewiesen.

Auf das „*outer compartment*“ folgen die C2–Schicht und das „*inner compartment*“, d.h. diejenigen Schichten, die bei der Metamorphose der Larve zum adulten Tier erhalten bleiben und die spätere Tunika der adulten Tiere bilden.

Die **C2–Schicht** ist durch zahlreiche Falten gekennzeichnet, die im REM und TEM gut darstellbar sind (Tafel 63; Tafel 64, Abb. 3 und 4). Sie wird begrenzt von einer relativ elektronendichten, etwa 50 nm dicken Lamina, darunter schließt sich etwas weniger elektronendichtes, faseriges Material an.

Das „*inner compartment*“ erscheint im TEM elektronentransparent (Tafel 63, Abb. 2 und 4). Im REM ist eine dichte Fasermatrix zu erkennen, die strukturell der Tunikamatrix in den Kolonien entspricht (drehrunde Fasern mit 15–25 nm Durchmesser, Streutextur, s. Abschnitt 3.2.1). In diese Matrix sind zahlreiche Tunikazellen eingebettet.

### **Tunikazellen im „*inner compartment*“**

Im „*inner compartment*“ liegen Pigmentzellen, Blaszellen und filopodiale Zellen. Morulazellen und kompartimentierte Zellen konnten nicht nachgewiesen werden, Kalkschuppen fehlen ebenfalls.

**Filopodiale Zellen** in der Larventunika sind größtenteils dem granulären Typ zuzuordnen, sie enthalten mäßig elektronendichte, membranumgebene Granula (Tafel 65, Abb. 1), außerdem häufig große lysosomale Kompartimente (Tafel 65, Abb. 4), z. T. mit Membranstapeln. Gelegentlich können in der larvalen Tunika auch granuläre filopodiale Zellen beobachtet werden, die neben elektronentransparenten Vesikeln und elektronendichten, membranumhüllten Granula auch eine große Vakuole enthalten (Tafel 65, Abb. 2), diese Zellen können nicht eindeutig dem granulären oder vakuolisierten Typ der filopodialen Zellen zugeordnet werden.

**Blaszellen** im „*inner compartment*“ liegen in zwei bis drei Reihen am äußeren Rand der Tunika (Tafel 63, Abb. 2). Die „zooidnahen“ Bereiche des „*inner compartment*“ enthalten kaum Blaszellen, dafür ausgedehnte Bereiche mit faserigem Matrixmaterial, filopodiale Zellen und Pigmentzellen.

**Pigmentzellen** in der larvalen Tunika haben etwa die gleiche Größe (Ø ca. 30 µm) und äußere Form wie die Pigmentzellen in Kolonien von *C. dellechiaiei* (Tafel 66, Abb. 1 und 3). Sie besitzen eine sehr große Vakuole und einen schmalen Cytoplasmasaum. Der Zellkern hat einen Durchmesser von etwa 5 µm. Die Vakuole ist angefüllt mit Netzwerkfibrillen und Pigmentkörnern.



In den meisten Pigmentzellen (= Grundtyp) ist die Größe und Verteilung der Pigmentkörner vergleichbar mit der Größe und Verteilung der Körner im Pigmentzellen–Grundtyp violetter Kolonien: Die Pigmentzellen enthalten zahlreiche kleine Körner ( $\varnothing$  0,2–0,9  $\mu\text{m}$ ) und wenige sehr große Körner ( $\varnothing$  3–7  $\mu\text{m}$ ; Tafel 66, Abb. 1). Zwischen Pigmentballen und Tonoplast ist ein transparenter Zwischenraum erkennbar.

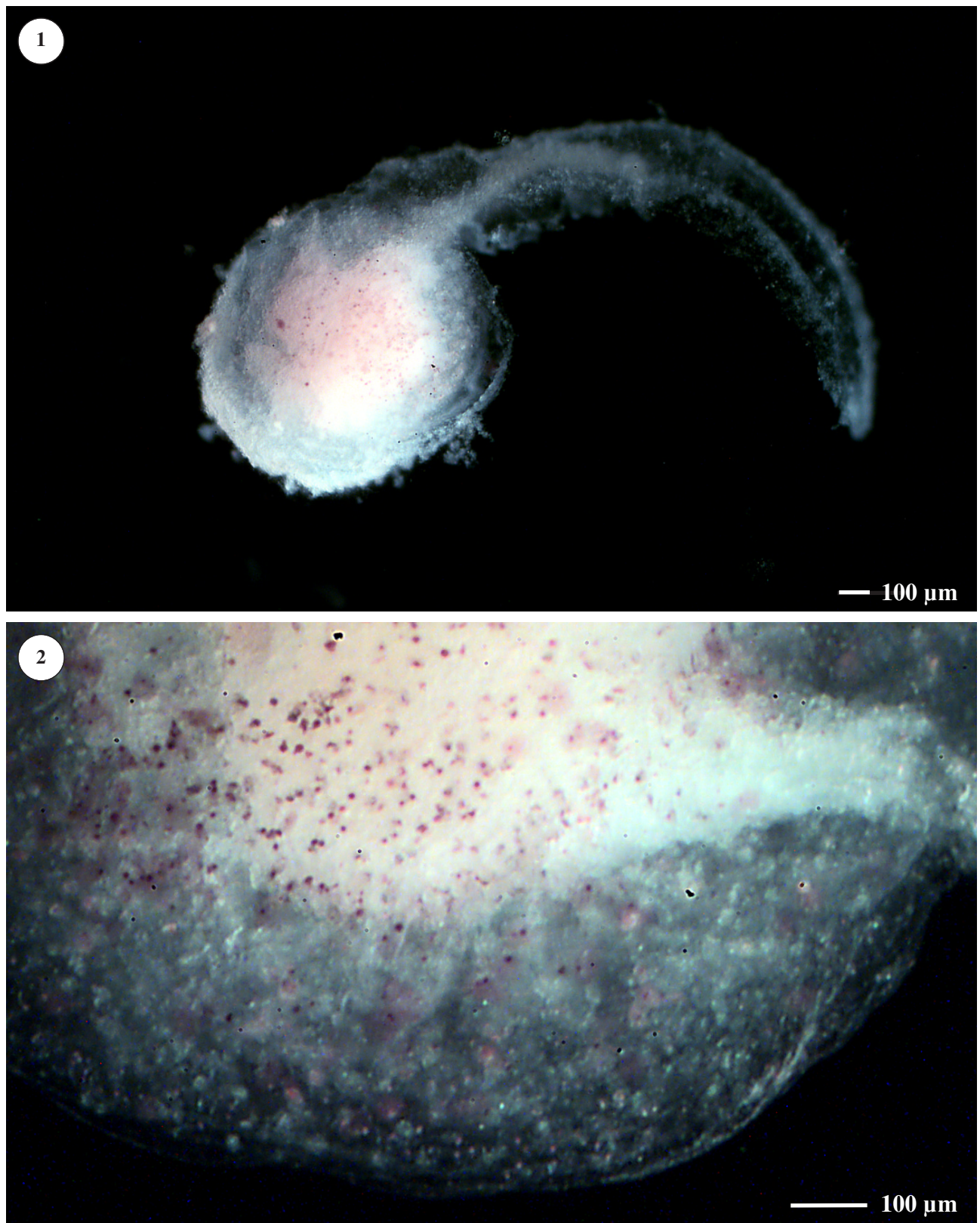
In einigen Zellen ist das Innere der größeren Pigmentkörner durchsetzt von zahlreichen, kugelförmigen Hohlräumen (= „Hohlraum–Typ“; Tafel 66, Abb. 3 und 4). Die Hohlräume sind durch eine granuläre Schicht vom übrigen homogen kontrastierten Innenbereich der Pigmentkörner abgegrenzt. Kleine Pigmentkörner enthalten keine Hohlräume. In Zellen dieses Bautyps ist das Fibrillennetzwerk in der Vakuole sehr dicht, die einzelnen Netzwerkfibrillen haben eine grobkörnige Oberfläche und erscheinen mehrfach geknickt oder gewinkelt. Jedes Pigmentkorn hat sehr viele Kontaktstellen mit dem Fibrillennetzwerk. Pigmentkörner dieses Zelltyps können daher als polyjunktionale bezeichnet werden. Der Pigmentballen insgesamt reicht an allen Seiten bis dicht an die Vakuolenmembran heran. Im REM sind viele Stellen erkennbar, an denen das Fibrillennetzwerk offensichtlich mit dem Tonoplasten verbunden war. Möglicherweise werden die Verbindungen durch Veränderungen in den Zellen bei der Fixierung des Materials gelöst.

In der Tunika der Larven treten Zellen auf, die sowohl Merkmale der granulären filopodialen Zellen, als auch der Pigmentzellen besitzen (Tafel 65, Abb. 3). Diese Zellen enthalten bereits eine Vakuole mit großen Pigmentkörnern und Fibrillennetzwerk, aber auch noch voluminöse cytoplasmatische Bereiche mit zahlreichen Einschlüssen. Es finden sich im Cytoplasma (außer dem Zellkern) zahlreiche elektronentransparente Vesikel unterschiedlicher Größe, Vesikel mit fibrillärem Material und homogene, mäßig elektronendichte Granula mit Membranhülle.

### 3.5.3 Bakterien in der larvalen Tunika

Auf der ornamentierten Außenschicht der larvalen Tunika liegen häufig stäbchenförmige Bakterienzellen. Im „outer compartment“ und auf der C2–Schicht sind keine Bakterienzellen nachweisbar (Tafel 63, Abb. 1). Das „inner compartment“ (= spätere Tunika) enthält dagegen viele Bakterienzellen, die sowohl im TEM als auch im REM unterhalb der C2–Schicht erkennbar sind (Tafel 63, Abb. 4). Lokal erreichen diese Bakterien hohe Dichten, ihre Verteilung im „inner compartment“ ist jedoch sehr inhomogen.

Die nachgewiesenen Bakterienzellen sind größtenteils Gram–negative Stäbchen, viele Zellen enthalten elektronentransparente Einschlüsse.

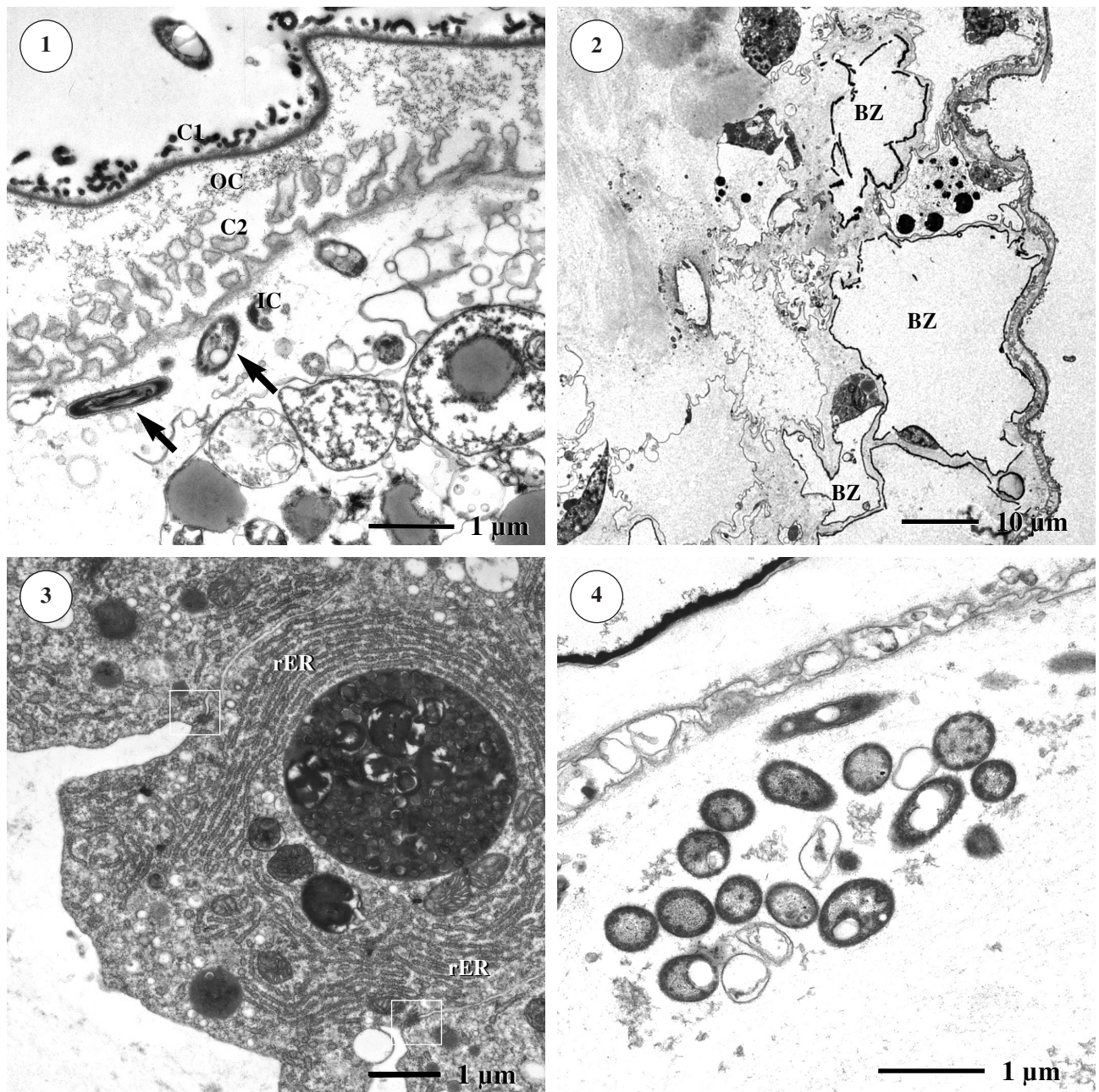


## Tafel 62

Larve von *C. dellechiaiei*

1. Lichtmikroskopische Aufnahme (Schrägbeleuchtung) einer aus einer Kolonie isolierten Larve. Die Larven besitzen einen ovoiden Körper und einen Schwanz mit Flossensaum.
2. Detailaufnahme der Larventunika. Die Tunikamatrix ist, wie bei *C. dellechiaiei*-Kolonien, transparent. In der Tunika sind zahlreiche rotviolette Pigmentzellen zu erkennen.

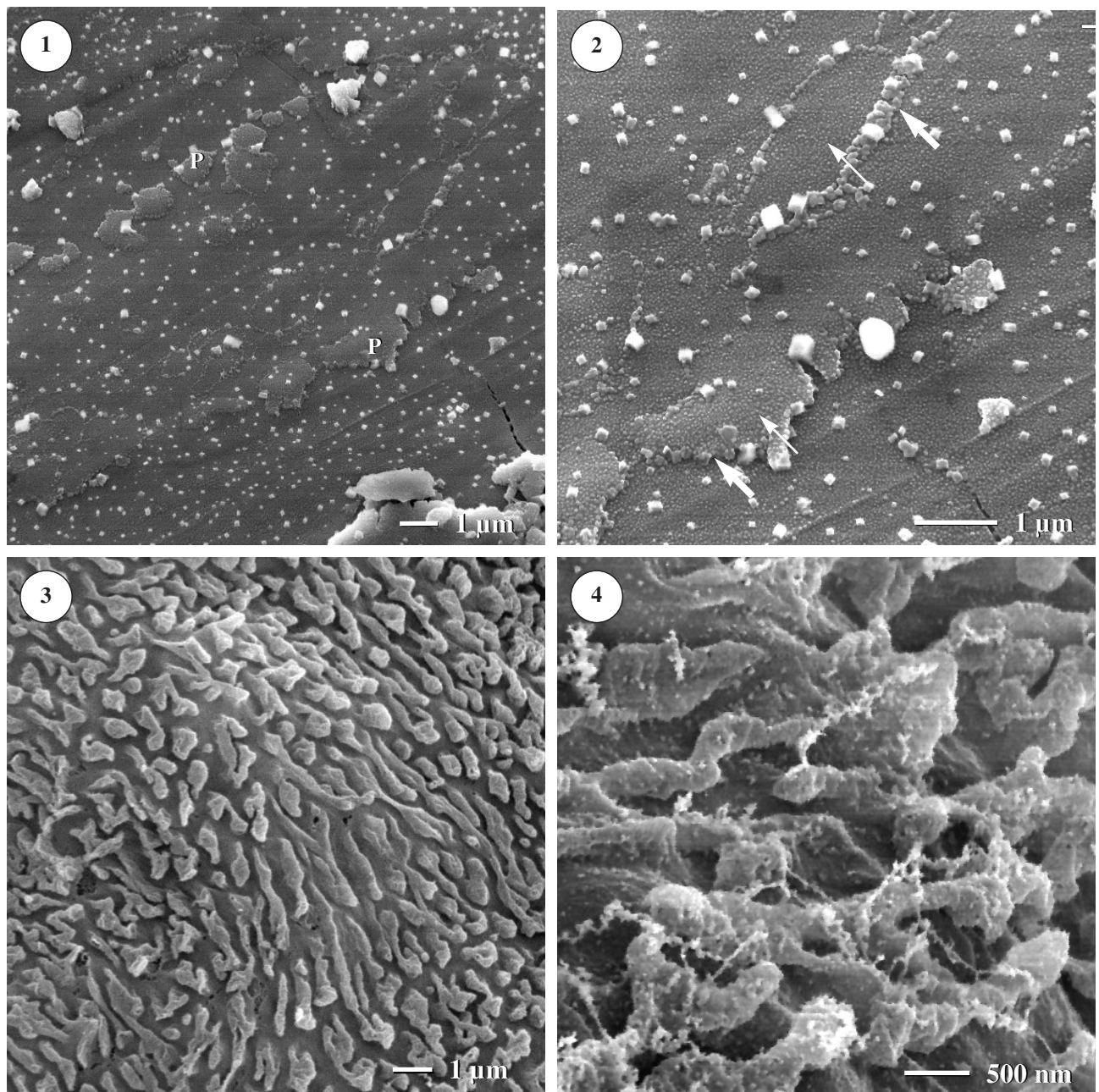


**Tafel 63**

Larvale Tunika (TEM).

1. Larventunika mit charakteristischer Schichtung. C1= C1-Cuticula, OC = *outer compartment*, C2= C2-Cuticula, IC = *inner compartment*. Nur das *inner compartment* enthält Bakterienzellen (Pfeile).
2. *Inner compartment* mit zwei bis drei Reihen von Blaszellen (BZ). Der Erhaltungszustand der Larventunika ist nach der Fixierung sehr schlecht, es entstehen Gewebedeformationen und Risse in den Zellmembranen.
3. Larvale Epidermiszelle mit sehr gut ausgebildetem, rauhem Endoplasmatischem Reticulum (rER). Eine charakteristische Eigenschaft der Epidermiszellen sind *tight junctions* (Rahmen).
4. Ansammlung von Bakterien im *inner compartment*. Die Bakterienzellen sind strukturell einheitlich (gleicher Zellwandaufbau, elektronentransparente Vesikel).

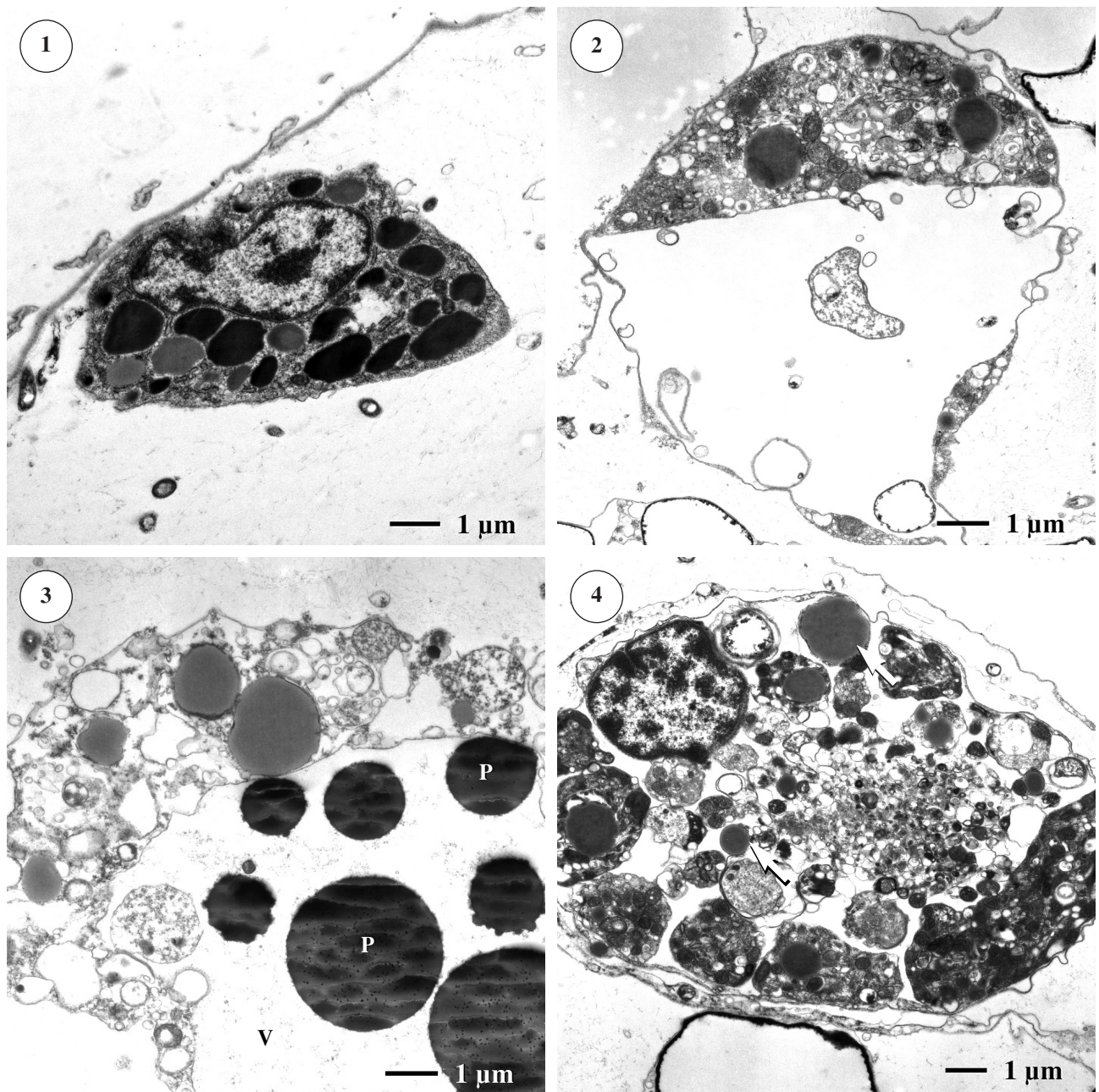


**Tafel 64**

Larvale Cuticula (REM, konventionelle Fixierung)

1. C1-Cuticula mit schollenförmigen *Plaques* (P).
2. C1-Cuticula. Die Cuticula bildet große (große Pfeile) und kleine (kleine Pfeile) papillenförmige Ornamente.
3. Übersichtsaufnahme der C2-Cuticula. Die C2-Cuticula bildet zahlreiche Falten.
4. Detailaufnahme der C2-Cuticula mit Falten.

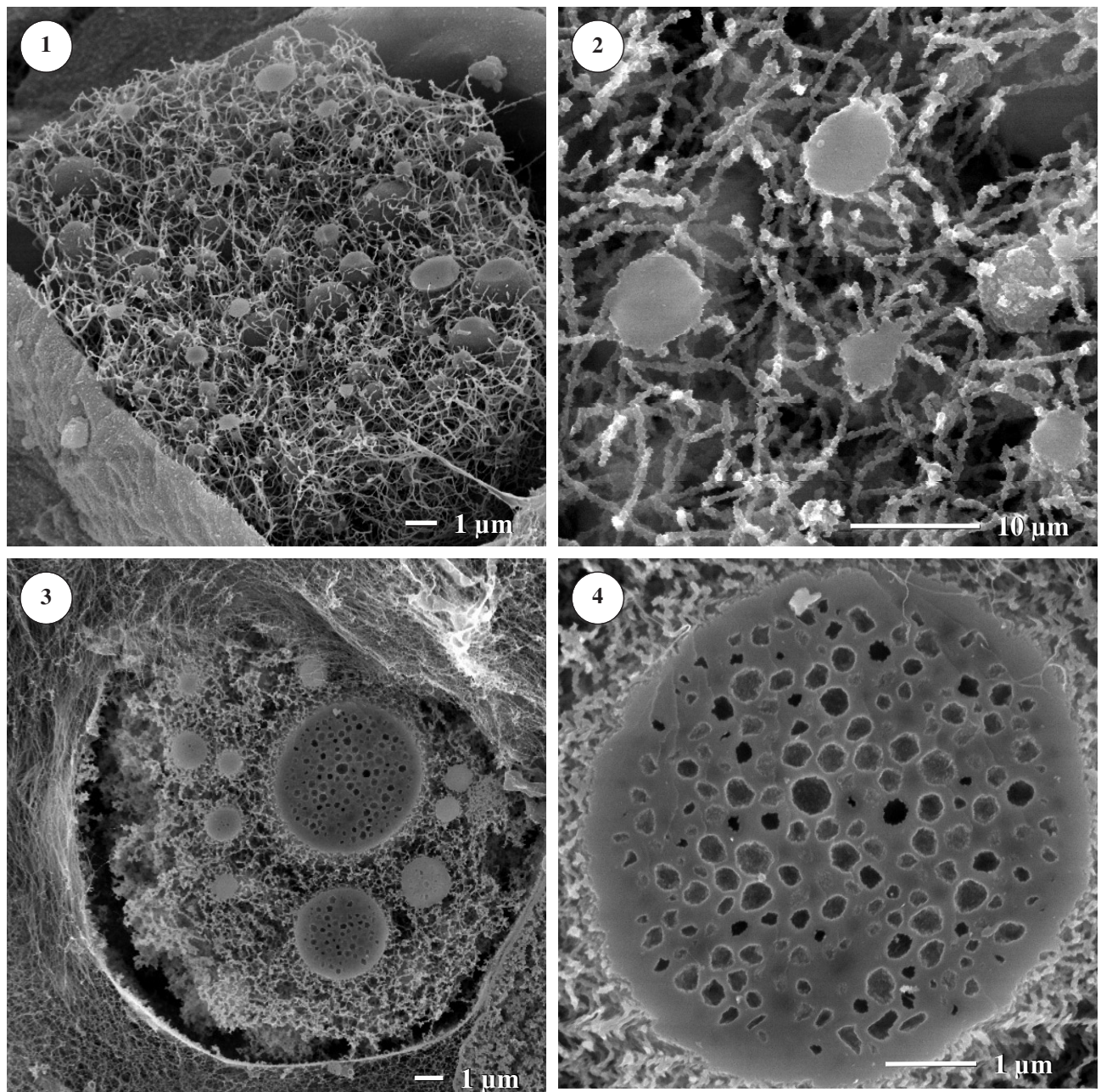


**Tafel 65**

Larvale Tunika, *inner compartment* (TEM).

1. Granuläre filopodiale Zelle mit verschiedenen elektronendichten Granula.
2. Granuläre filopodiale Zelle mit großer, elektronentransparenter Vakuole.
3. Granuläre filopodiale Zelle (?) mit großer Vakuole (V) und Pigmentkörnern (P).
4. Zelle mit großen lysosomalen Kompartimenten und homogenen Granula (Pfeile).



**Tafel 66**

Larvale Tunika, Pigmentzellen (REM, Kryobrüche nach TANAKA)

1. Pigmentzellen-Grundtyp in der larvalen Tunika.
2. Detailaufnahme einer Grundtyp-Pigmentzelle. Bruchflächen der Körner sind etwa kreisförmig, jedes Korn besitzt mehrere Kontaktstellen mit dem Fibrillennetzwerk (oligojunktionale).
3. Polyfunktionale Pigmentzelle in der Larventunika mit dichtem Fibrillennetzwerk und großen Pigmentkörnern. Im Inneren der Körner sind zahlreiche Hohlräume zu erkennen.
4. Detailaufnahme eines Pigmentkorns in der Zelle aus Abb. 3. Das Pigmentkorn hat an zahlreichen Stellen Kontakt mit dem Fibrillennetzwerk der Zelle und ist von kugelförmigen Hohlräumen durchsetzt.



## 4. Diskussion

### 4.1 Die Tunika als Integument – protektive Mehrfachstrategien

Bereits der Habitus der Kolonien zeigt die Bedeutung des Tunikagewebes für die Kolonien von *C. dellechiaiei*: Die Tunika stellt mit weit über 90% den Hauptanteil des Kolonievolumens. Trotzdem steht beim Wachstum der Kolonien stets die Vermehrung und optimale Versorgung der Zooide im Vordergrund: die Kolonien wachsen niemals in die Höhe, sondern vergrößern ihre Grundfläche, um mehr Zooiden Platz bieten zu können (Tafel 10). Wie ist jedoch die massive Ausbildung des Tunikagewebes funktionell zu deuten? Oberflächlich betrachtet, stellt *C. dellechiaiei* eine ideale Beute für verschiedenste Prädatoren dar: die Kolonien sind im Verbreitungsgebiet relativ häufig, wachsen festgeheftet an leicht zugänglichen Orten und besitzen keine harte Außenschale (Tafel 10). Sie sind zwar nicht sehr auffällig gefärbt, zeigen aber auch keine spezielle Tarnfärbung (Tafel 10). Im Gegensatz zu vielen anderen sessilen oder wenig beweglichen marinen Invertebraten verfügen sie also nicht über von außen erkennbare Schutzmechanismen. Trotzdem konnte weder durch Literaturrecherchen, noch in eigenen Beobachtungen ein potentieller Fraßfeind von *C. dellechiaiei* ausgemacht werden. Auch Kolonien mit Fraßschäden, wie sie bei Schwämmen (z.B. *Petrosia ficiformis*) relativ häufig zu finden sind, wurden bei *C. dellechiaiei* nicht beobachtet. Bei der mikroskopischen Untersuchung wurden jedoch verschiedene Eigenschaften des Tunikagewebes deutlich, die als Schutzmechanismen der Zooide gegenüber Prädatoren dienen könnten.

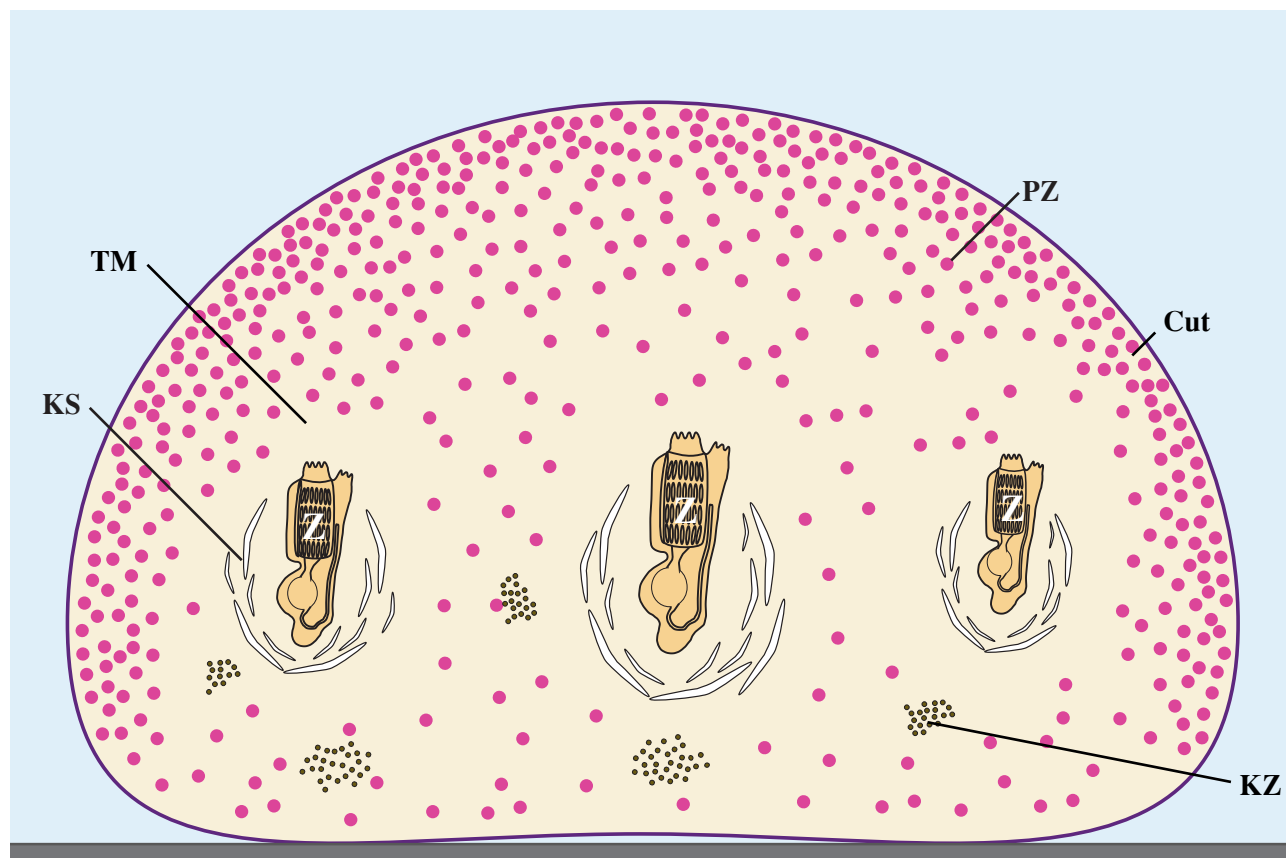
#### Volumen und Lage der Tunika

Das große Volumen der Tunika im Verhältnis zum Volumen der Zooide stellt bereits eine Möglichkeit dar, die Zooide vor Fraßfeinden zu schützen. Bei Angriff durch Räuber ist so die Wahrscheinlichkeit für einen Tunikaschaden viel größer als für den Verlust eines Zooids. Dies wird noch dadurch verstärkt, daß die Zooide sich im unteren, substratzugewandten Bereich der Kolonien befinden und daher zur Meerwasserumgebung hin durch eine dicke Tunikaschicht geschützt sind (schematische Darstellung s. Tafel 67).

#### Säuregehalt der Blaszellen

Säurehaltige Abwehrstoffe wurden bei Meerestieren bereits 1854 von TROSCHER entdeckt; er bemerkte bei der Untersuchung von Gastropoden des Mittelmeeres, daß der Speichel der Schnecke *Tonna* (= *Dolium*) *galea* den Marmorfußboden seines Laboratoriums anlöste (THOMPSON 1988). Bei solitären Ascidien scheint diese Form der Feindabwehr besonders verbreitet zu sein: *Ascidiella aspersa*, *Ascidiella scabra*, *Ascidia mentula* und *Phallusia nigra* besitzen säurehaltige Zellen in ihrer Tunika (THOMPSON 1988, HIROSE 1999). Mit *Cystodytes lobatus* (s. LAMBERT 1979) und nun auch *C. dellechiaiei* können dieser Liste zwei koloniebildende Ascidien hinzugefügt werden.

Durch Anfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff konnte nachgewiesen werden, daß sich die Säuren innerhalb zellulärer Elemente in der Tunika befinden, die Tunikamatrix aber pH-neutral ist (Tafel 26, Abb. 4). Die von HAWKINS et al. (1983) an verschiedenen Ascidien gemachte Beobachtung, daß Säuren aus Tunikazellen freigesetzt werden, die im intakten



### Tafel 67

Schematische Darstellung des Kolonieaufbaus von *C. dellechiaiei* (violette Kolonie; Zellgrößen nicht maßstabsgetreu).

Die Kolonien bestehen zum größten Teil aus Tunikagewebe und werden zur Meeresumgebung hin durch eine dünne Cuticula (Cut) abgeschlossen. Die Zooide (Z) liegen in den unteren Bereichen der Kolonie und sind nach außen hin durch Tunikagewebe geschützt. Zusätzlich sind sie von einer harten, mehrschichtigen Kapsel aus überlappenden Kalkschuppen (KS) umgeben.

Die roten Pigmente (= toxische Pyrdoacridinalkaloide) sind in Pigmentzellen (PZ) gespeichert, die in großer Zahl in der Tunika nachgewiesen wurden. Die äußeren Schichten der Tunika sind stärker pigmentiert als die inneren Bereiche; sie enthalten wesentlich mehr Pigmentzellen. Vermutlich schützen die äußeren, toxischen Tunikaschichten die Zooide vor Fraßfeinden.

Im unteren Drittel der Kolonien befinden sich zahlreiche kompartmentierte Zellen (KZ). Dieser Zelltyp tritt stets in Gruppen von 5–50 Einzelzellen auf und enthält gelbe und braune Pigmente. Die chemische Struktur dieser Pigmente ist noch unbekannt.

Zooide, Kalkschuppen und Tunikazellen sind in eine gemeinsame »Grundsubstanz«, die Tunikamatrix (TM), eingebettet.

Zustand neutral sind, gilt für *C. dellechiaiei* offensichtlich nicht, da die Säure in den Vakuolen intakter Blaszellen direkt nachgewiesen werden konnte (Tafel 26). Dies erscheint auch sinnvoll, da frei in der Tunikamatrix gebildete Säuren durch eindringendes Meerwasser rasch neutralisiert würden. Die Tonoplastenmembran trennt den sauren Vakuoleninhalt vom neutralen Cytoplasma und ermöglicht so – ähnlich wie in der Vakuole vieler Pflanzenzellen (ANDERSON und ORCI 1988) – eine intrazelluläre Lagerung der Säuren.

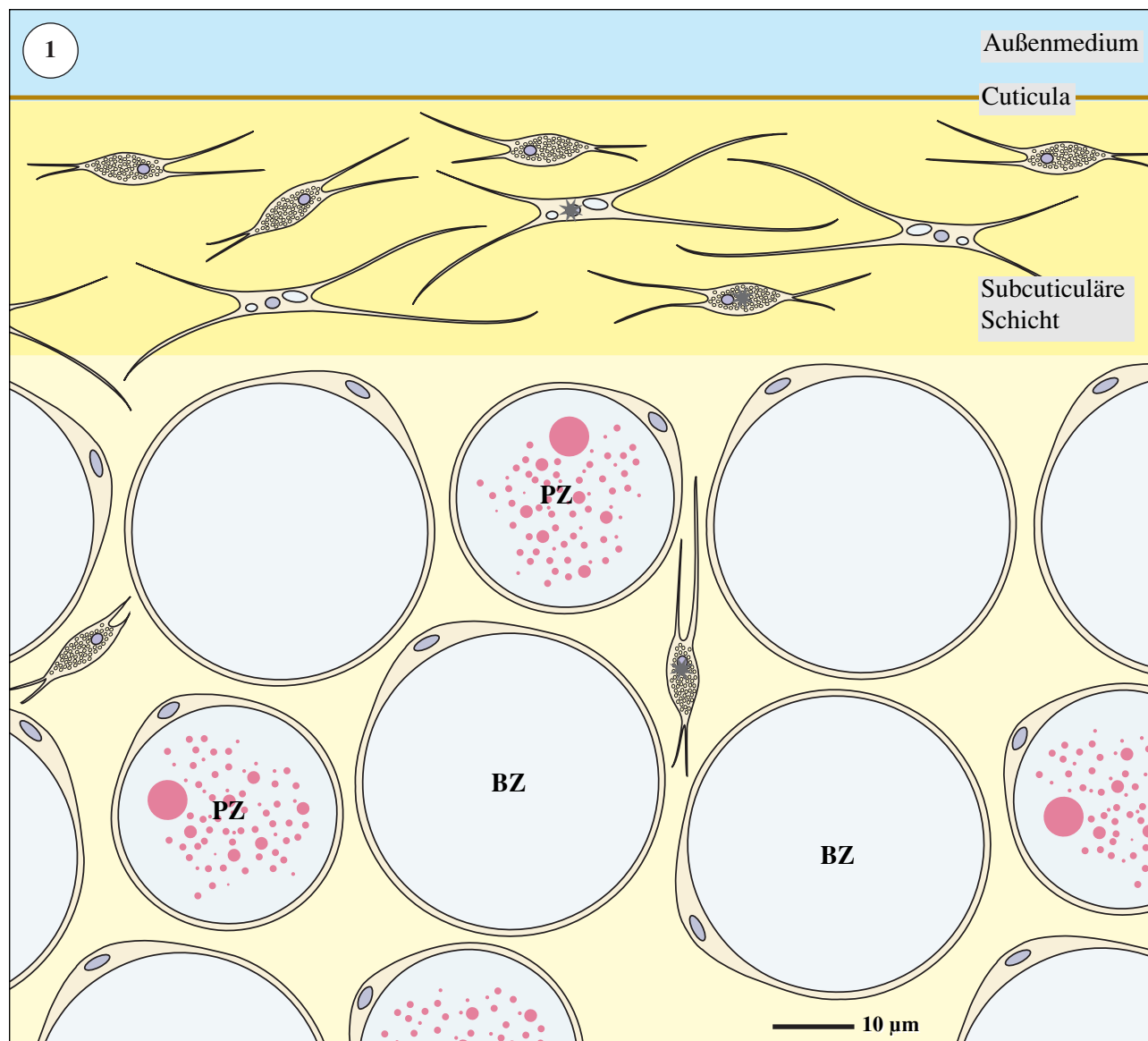
Die Blaszellen bei *C. dellechiaiei* bewirken sogar in zweifacher Hinsicht eine Verbesserung des Zooidschutzes: Erstens vergrößern sie das Tunikavolumen bei geringem Materialverbrauch erheblich, und zweitens beinhalten sie einen direkt wirkenden Abwehrstoff. Dieser kommt in großen Mengen (Häufigkeit und Größe der Blaszellen!) und großer Stärke (pH 1 – 2, oxidierende Säure!) vor, so daß die abschreckende Wirkung bei der rasch eintretenden Verdünnung durch leicht alkalisches Meerwasser länger erhalten bleibt.

Bei verschiedenen Tunikatenarten wird ebenfalls diskutiert, ob gelegentlich eine „Desinfektion“ der Oberflächen durch Säurefreisetzung oder durch Abgabe antimikrobieller Stoffe stattfindet (STOECKER 1978, HIROSE 1999). Für *C. dellechiaiei* konnte diese Funktion der Tunikasäuren nicht bestätigt werden. Längere Zeit gehältere Kolonien werden zunehmend von Mikroorganismen überwachsen, obwohl ihnen ausreichend Säure in den unveränderten Blaszellen zur Verfügung stünde. Obwohl diese „Reinigungsmethode“ wegen der sehr schwachen Strömung im Aquarium vermutlich länger und somit gründlicher wirken könnte als bei freilebenden Kolonien, konnten keine Hinweise dafür gefunden werden, daß Säure oder antimikrobielle Substanzen aus den Kolonien ohne Fremdeinwirkung freigesetzt werden. Vermutlich sind bei freilebenden Kolonien von *C. dellechiaiei* andere Tunikastrukturen (z.B. anti-adhäsive Matrixsubstanzen, s. Abschnitt 4.2) und die an den Standorten stets vorhandene Strömung für die unbewachsenen Oberflächen verantwortlich.

### Kalkschuppen

Harte, kristalline Elemente (Kalk oder Silikate) als Schutzmechanismus können bei fast allen Schwämmen (WESTHEIDE und RIEGER 1996) und bei einigen koloniebildenden Ascidien (VAN NAME 1945, MILLAR 1971) beobachtet werden. Sie dienen zum einen als Fraßschutz, zum anderen bewirken sie eine erhöhte Stabilität und Festigkeit der Gewebe. Bei den meisten Organismen sind diese kristallinen Elemente weit im Gewebe verstreut. Bei *Cystodytes lobatus* (LAMBERT 1979) und *C. dellechiaiei* sind sie jedoch kapselartig um die Zooide herum angeordnet, da offensichtlich der gezielte Schutz und die Stabilisierung der Zooide angestrebt wird (Tafel 11; Schema s. Tafel 67). G. LAMBERT untersuchte 1979 die Bildung der Kalkschuppen bei *C. lobatus* und postulierte eine extrazelluläre Entstehung der Kalkschuppen, allerdings unter Beteiligung von Tunikazellen. Vermutet wurde, daß sowohl um die Kalkschuppen herum, als auch in ihrem Inneren eine organische Matrix vorliegen müsse, an der die Kristallisation stattfindet. Diese Vermutung konnte in der vorliegenden Arbeit an *C. dellechiaiei* bekräftigt werden: Mikroskopie und EDX-Analyse zeigen, daß organische, faserartige Strukturen im Inneren der Kalkschuppen vorliegen und die gesamte Kalkschuppe in eine membranöse Tasche eingebettet ist (Tafel 25). Die Bildung der Kalkschuppen findet wahrscheinlich intrazellulär oder zumindest unter zellulärer Beteiligung statt.



**Tafel 68**

Schematische Darstellung der Kolonieaußenschichten von *C. dellechiaiei*.

Die Kolonie wird von Cuticula und subcuticulärer Schicht (= Zone mit sehr dicht gepackten Matrixfasern) zur Meeresumgebung hin abgegrenzt.

Die Cuticula ist sehr dünn und zellfrei. Die subcuticuläre Schicht enthält zahlreiche filopodiale Zellen (Sterne), die mit ihren Ausläufern ein dichtes Netzwerk bilden, aber keine Blaszellen oder Pigmentzellen. Unterhalb der subcuticulären Schicht sind zahlreiche Blaszellen (BZ) und Pigmentzellen (PZ) in die (hier weniger dichte) Tunikamatrix eingebettet.

In den oberen Tunikaschichten fehlen kompartimentierte Zellen, sie liegen stets in den unteren Bereichen der Kolonie zwischen den Zooiden.

### Pigmente als Abwehrstoffe

Die Anhäufung toxischer Pigmente in spezialisierten Zellen der Tunika deutet ebenfalls auf eine protektive Rolle der Tunika hin (s. Abschnitt 4.4). Die Untersuchungen von Dr. B. STEFFAN an Zooid-Extrakten bestätigen ebenfalls, zumindest bei violetten Kolonien, daß die Pigmente nicht im Zooid gebildet oder gespeichert werden, da Zooidgewebe weder Shermilamin noch Kuanoniamin enthalten (STEFFAN, persönliche Mitteilung).

Zum einen bietet die Ablagerung der giftigen Pigmente im Tunikagewebe wiederum den Vorteil einer dicken Schutzschicht nach außen für die Zooide (Tafel 67), zum anderen werden die Zooide selbst von der cytotoxischen Wirkung der Pigmente vermutlich weniger beeinflußt. Da die Pigmente vor allem teilungsaktive Zellen hemmen (Tabelle 1), würde sich eine massive Anhäufung dieser Stoffe in den Zoiden wahrscheinlich ungünstig auf Wachstum und Vermehrung der Zooide auswirken. Da frühere Untersuchungen an Tuniken anderer Ascidienarten zeigten, daß die Tunikazellen aus den Zoiden in die Tunika einwandern (BURIGHEL und CLONEY 1997) und bei *C. dellechiaiei* keine Zellteilungsstadien von Tunikazellen beobachtet wurden, ist eine Speicherung der toxischen Substanzen dort vermutlich tolerierbar – auch im Fall der Pigmentfreisetzung in die Tunikamatrix bei Verletzung der Kolonien.

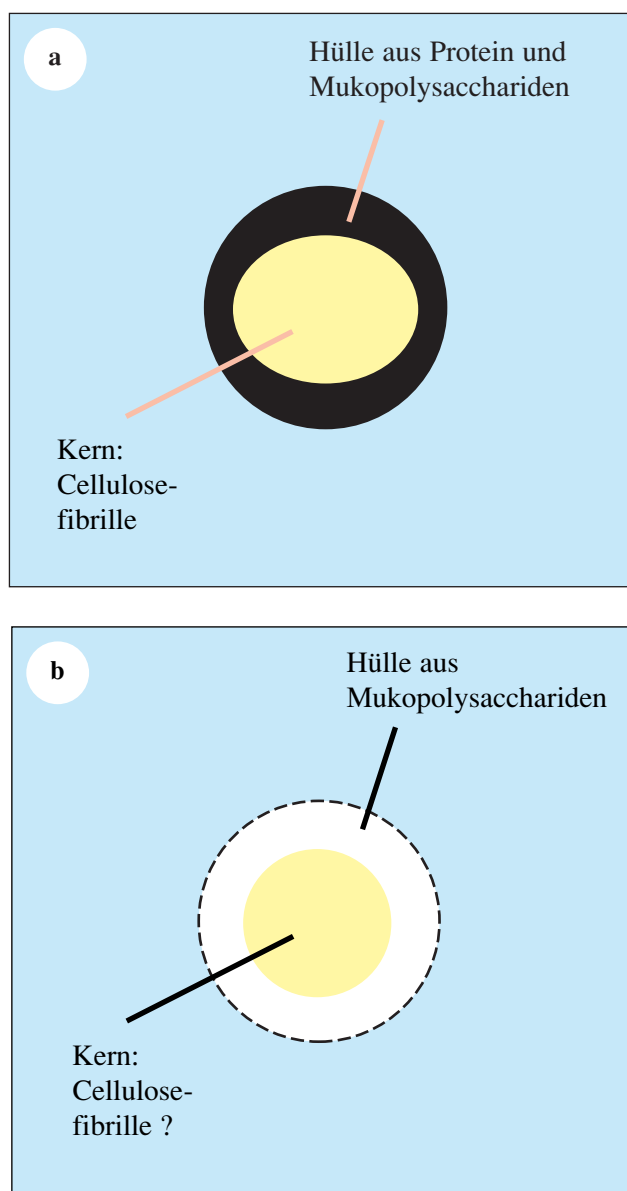
## 4.2 Die Tunikamatrix – Biopolymere mit vielfältigen Eigenschaften

Nur bei wenigen Ascidienarten wurden bisher Untersuchungen an der intakten Tunikamatrix durchgeführt. Die meisten Analysen der Tunikasubstanzen beruhen auf Tunika-Homogenisaten und -Lysaten, die gegebenenfalls weiter aufgeschlossen und auf ihre Zusammensetzung hin untersucht wurden (ABDERHALDEN 1911, SMITH und DEHNEL 1970, PAVÃO et al. 1998). Daher können diese Literaturdaten nur bedingt mit den an intaktem Tunikagewebe von *C. dellechiaiei* erarbeiteten Ergebnissen verglichen werden.

Charakteristisch ist bei allen untersuchten Arten ein Grundaufbau der Tunikamatrix aus faserigem Material, an dessen Bildung zumindest teilweise hochkristalline Cellulose („Tunicin“) beteiligt ist (FREY-WYSSLING und FREY 1950, MISHRA und COLVIN 1969, SMITH und DEHNEL 1970, KRISHNAN 1975, KRISHNAN und RAMAMURTHI 1976, DE LEO 1977, PATRICOLO und DE LEO 1979, VAN DAELE 1990, VAN DAELE et al. 1992, LÜBBERING-SOMMER et al. 1996). Die Größe, Orientierung und Zusammensetzung der Fasern variiert jedoch beträchtlich. Die Fasern, die die Matrix von *C. dellechiaiei* bilden, entsprechen strukturell keinem der in der Literatur dargestellten Tunika-Fasertypen.

Zunächst kann ausgeschlossen werden, daß es sich bei den Matrixfasern von *C. dellechiaiei* um reine Cellulosefasern handelt (Unempfindlichkeit gegenüber Cellulase und cellulose-lösenden Reagenzien, keine Färbung mit Chlorzinkjod, charakteristische Färbung mit Alcianblau, geringer Glucosegehalt der Tunikasubstanz, vgl. Abschnitt 3.2.1).

Da die Matrixfasern nur sehr schwach und, wie durch vergleichende raster- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen festgestellt werden konnte, vermutlich nur im Kernbereich mit den verwendeten Schwermetallen kontrastierbar sind (Abschnitt



### Tafel 69

Schematische Darstellung des Querschnitts durch eine Fibrille der Tunikamatrix.

a Aufbau der Matrixfasern der Solitärascidie *Halocynthia papillosa* (Schemazeichnung nach Textvorgaben und Fotografien aus VAN DAELE et al. 1992). Der Kern der Faser besteht aus hochkristalliner Cellulose. Die Hülle wird von Proteinen und Mukopolysacchariden gebildet. Aufgrund des hohen Proteinanteils reagiert die Hüllschicht gut mit den verwendeten Kontrastierungsmitteln und ist daher in dieser Schemazeichnung schwarz dargestellt.

b Postulierter Aufbau der Fasern bei *Cystodytes dellechiaiei*. Weder der Kern, noch die Hülle der Fasern werden durch Osmiumtetroxid, Uranylacetat oder Bleicitrat kontrastiert. Da Mukopolysaccharide zur Bildung von Fibrillen ein Strukturpolymer benötigen, wird vermutet, daß der Kern der Matrixfibrillen aus Cellulose besteht.



3.2.1, schematische Darstellung s. Tafel 69), enthalten sie wahrscheinlich nur geringe Mengen an Proteinen. Damit unterscheiden sie sich z.B. von den Fasern in *Halocynthia papillosa* und *Phallusia mamillata* (VAN DAELE 1990), die (bei Verwendung von Uranylacetat und Bleicitrat) einen nicht kontrastierten Kern (hochkristalline Cellulose) und eine stark kontrastierte Hülle (Proteine und Mukopolysaccharide) aufweisen. „Gebänderte“ Kollagenfasern, die bei vielen marinen Wirbellosen, manchen Ascidien und bei Vertebraten (PATRICOLO und DE LEO 1979, WELSCH 1997) charakteristische Bestandteile des Bindegewebes bzw. der Tunika sind, treten in der Tunika von *C. dellechiaiei* nicht auf (Abschnitt 3.2.1).

Die Färbbarkeit der Matrix in der PAS-Reaktion (Periodsäure-Schiff-Reaktion; s. Tafel 16) zeigt, daß Polysaccharide und/oder neutrale Mukopolysaccharide am Aufbau der Matrix beteiligt sind. Die Unterscheidung zwischen beiden Stoffgruppen ist mit gängigen Färbereaktionen allerdings nicht möglich. Bei den PAS-positiven Substanzen könnte es sich um das celluloseähnliche Tunicin handeln. Da jedoch von verschiedenen Autoren festgestellt wurde, daß die PAS-Reaktion nicht alle tunicinhaltigen Gewebe anfärbt (KRISHNAN 1975, VAN DAELE et al. 1992), kann nur aufgrund der PAS-Reaktion nicht auf das Vorhandensein von Cellulosederivaten geschlossen werden. PAS-positive Bereiche der Matrix von *C. dellechiaiei* könnten Cellulose und Glykogen ebenso wie Glykoproteine enthalten. In anderen Ascidientuniken wurden diese Substanzen bereits mehrfach nachgewiesen (HALL und SAXL 1960, SMITH und DEHNEL 1970, CASSARO und DIETRICH 1977, LÜBBERING-SOMMER et al. 1996, PAVÃO et al. 1998). Derzeit wird *C. dellechiaiei* in Kooperation mit dem Institut für Holzforschung der TU München (Prof. J. FROMM) mit spektroskopischen Methoden weiter untersucht, um eindeutig nachzuweisen, ob die Tunika Cellulosederivate enthält.

Die Ergebnisse der Alcianblaufärbungen bei zwei verschiedenen pH-Werten zeigen, daß saure, sulfatierte Mukopolysaccharide einen großen Teil der Matrix bei *C. dellechiaiei* bilden (Tafel 16). Dies erklärt auch die schwache Kontrastierbarkeit mit Schwermetallen (nur Kernbereiche der Fasern sind im TEM darstellbar, Tafel 13), da Mukopolysaccharide nicht oder nur geringfügig mit den in der Transmissionselektronenmikroskopie üblichen Kontrastierungsmitteln (Osmiumtetroxid, Uranylacetat, Bleicitrat) reagieren (SCOTT 1985). Ein weiteres Indiz für das Vorliegen saurer, sulfatierter Mukopolysaccharide ist der hohe Schwefelgehalt der Tunikamatrix, der mittels *Energy Dispersive X-ray* (EDX)-Analyse nachgewiesen werden konnte (Tafel 17).

Dieses Ergebnis deckt sich gut mit den Befunden anderer Autoren: Bereits bei mehreren Ascidienarten, darunter auch bei *Cystodytes lobatus* (LAMBERT 1979), wurden saure Mukopolysaccharide als Bestandteile der Tunikamatrix identifiziert (SMITH 1970b, SMITH und DEHNEL 1970, KRISHNAN 1975, VAN DAELE 1990 und VAN DAELE et al. 1992). Bisher wurde aber nicht eindeutig geklärt, ob Mukopolysaccharide an die Tunika-Matrixfasern angelagert sind, oder eine „amorphe Grundsubstanz“ bilden, in die die Matrixfasern eingebettet sind. Mukopolysaccharide liegen in Bindegeweben üblicherweise in stark gequollener Form als „amorphe Grundsubstanz“ (HAY 1981) vor, zur Bildung von Fibrillen ist daher ein Gerüstmolekül notwendig, an das Mukopolysaccharide binden können (z.B. Kollagenfaser).

Mukopolysaccharide sind wegen ihres dominierenden Polysaccharidanteils schlecht chemisch fixierbar und unterliegen häufig starken Veränderungen bei der Präparation für die Elektronenmikroskopie (SCOTT 1985). Bekannte Artefakte sind zum Beispiel Materialverluste durch Lösung oder die Anlagerung an vorhandene Bindegewebsfasern während des Entwässerungsvorgangs (SCOTT 1985).

Durch die Verwendung des Kryo–Rasterelektronenmikroskops stand eine sehr gute Technik zur Verfügung, die Tunikamatrix in voll hydratisiertem Zustand ohne vorherige chemische Behandlung und daher ohne Materialverlust zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, daß zwischen den Matrixfasern keine durchgehende amorphe Grundsubstanz vorhanden ist, die größeren Zwischenräume zwischen den einzelnen Fasern sind offensichtlich wassergefüllt. Folglich müssen die in der Tunika nachgewiesenen Mukopolysaccharide bereits *in vivo* an die Matrixfasern angelagert sein. Möglich wäre z.B., daß um eine zentrale Faser aus cellulose-ähnlichen Stoffen („Tunicin“) eine Hülle aus Mukopolysacchariden ausgebildet wird (Schema s. Tafel 69). Dies würde auch erklären, warum der Zusammenhalt der Matrix durch Xanthogenat oder Cellulase nicht aufgelöst werden kann: Die Cellulosefaser wäre vermutlich für angreifende Substanzen nicht zugänglich. Analog dazu können cellulosespezifische Färbereagenzien (Chlorzinkjod) keine Anfärbung herbeiführen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen VAN DAELE et al. (1992) bei der Untersuchung von Tunikafasern von *Halocynthia papillosa*, allerdings ist hier der Proteinanteil der Fasern offensichtlich wesentlich höher als bei *C. dellechiaiei* (deutlicher Kontrast der „Hülle“ bei Behandlung mit Schwermetallen; Vergleich s. Tafel 69).

Der Aufbau einer Tunikamatrix aus Cellulose und/oder Mukopolysacchariden hat für die Kolonien von *C. dellechiaiei* mehrere Vorteile:

### 1. Säurebeständigkeit

Die Matrixfasern von *C. dellechiaiei* haben offensichtlich eine hohe Toleranz gegenüber starker Schwefelsäure, die bei Verletzung der Tunika aus den Blasenzellen freierwerden kann (s. Abschnitt 3.2). Dadurch unterscheiden sich die Matrixfasern bei *C. dellechiaiei* von Kollagen und Cellulose, die zumindest teilweise unter Säureeinwirkung aufgelöst werden (LISON 1960, FALBE und REGITZ 1989, KLEINIG und SITTE 1992) und damit ihre strukturbildenden Eigenschaften verlieren würden.<sup>1</sup>

### 2. Geringer Bedarf an Baumaterial

Mukopolysaccharide (= Glycosaminoglycane) stellen eine gute Möglichkeit dar, bei geringem Materialverbrauch eine voluminöse Matrix auszubilden. Sie haben die Eigenschaft, sehr viel Wasser zu binden. Dadurch kann das Volumen der Mukopolysaccharidmoleküle um das 1000 bis 10 000 fache größer sein als das Gesamtvolumen ihrer

<sup>1</sup> Im Körper des Menschen werden Mukopolysaccharide z.B. produziert, um das Magenepithel vor der Säureeinwirkung durch den Magensaft zu schützen (Magenschleimhaut, LEONHARDT 1990). Auch hier wird ihre hohe Beständigkeit gegenüber Säuren deutlich.

Kohlenhydrateinheiten (LÖFFLER und PETRIDES 1990). Wasser steht marinen Lebewesen in ausreichender Menge zur Verfügung, der Bedarf an organischem Material für die Ausbildung voluminöser Mukopolysaccharidschichten ist daher minimal. Dies schlägt sich in den sehr niedrigen Massen organischer Substanz in der Tunika nieder (vgl. Abschnitt 3.2.1). Die dreidimensionale Struktur gequollener Mukopolysaccharide läßt sie die Funktionen einer selektiven, plastischen Barriere (Molekularsieb, RIEDE und SCHAEFER 1993) erfüllen, wodurch der Stoffdurchtritt durch die Tunika zu den Zooiden begrenzt und mechanischer Schutz gewährleistet wird.

### 3. Vermindertes „*microfouling*“

Ein dritter, möglicherweise ökologisch relevanter Vorteil von sauren, sulfatierten Mukopolysacchariden als Bausubstanz ist, daß sie aufgrund ihrer negativen Ladung eine dicke Wasserhülle ausbilden, die die Anheftung von Bakterien und anderen Mikroorganismen erschwert (MCKENZIE und GRIGOLAVA 1996, BAVINGTON et al. 1999). Bakterienzellen werden durch die Wasserströmung rasch entfernt, bevor sie fest an die Oberfläche der Kolonien binden können. Dies wird von MCKENZIE und anderen Autoren als dominanter Faktor für die Bewuchsfreiheit der Körperoberflächen von Echinodermaten angesehen (MCKENZIE und GRIGOLAVA 1996, BAVINGTON et al. 1999). Bei *C. dellechiaiei* könnte die Zusammensetzung der Tunikamatrix also zur Bewuchsfreiheit der Kolonieoberfläche beitragen und somit Infektionen vorgebeugt, sowie Verstopfungen der Tunikakanäle durch „*fouling*“-Organismen vermieden werden. Bei fehlender Wasserbewegung nimmt die Effektivität dieses („passiven“) Abwehrmechanismus ab. Da im Aquarium vermutlich ohnehin eine höhere Bakteriendichte herrscht als im natürlichen Habitat und gleichzeitig nur schwache Strömung herrscht, kann sich bei gehälterten Kolonien eine dichte Aufwuchsschicht (= „*microfouling*“) ausbilden.

Die physikochemische Eigenschaft von Mukopolysacchariden, Adhäsionsvorgänge zu verhindern, führte zu massivem Einsatz dieser Stoffe als Gerinnungshemmer zur Vorbeugung und Behandlung von Thrombosen und Embolien. Bisher wird für diesen Zweck vor allem das Mukopolysaccharid Heparin verwendet. Erste Untersuchungen von PAVÃO et al. (1998) zeigten aber bereits, daß hochsulfatierte Mukopolysaccharide (Dermatansulfate) aus Ascidien (*Styela plicata* und *Halocynthia pyriformis*) ebenfalls potente Antikoagulantien sind.

Ein effektives Hindernis für in die Tunika einwandernde Bakterienzellen ist die subcuticuläre Außenschicht der Tunika, die aus sehr dicht liegenden Matrixfasern aufgebaut ist (schematische Darstellung s. Tafel 68). Die Zwischenräume zwischen den Matrixfasern sind mit maximal 0,5 µm in der subcuticulären Schicht gerade einmal so groß wie der Durchmesser der meisten Bakterienzellen (s. Tafel 15, Abb. 5). Durch die Streutextur der Matrixfasern bilden sich aber keine Durchlaßkanäle, da stets viele Faserschichten übereinanderliegen („Siebeffekt“).



### 4.3 Regression im Aquarium– Überdauerung ungünstiger Umgebungsbedingungen

Die Strategie, ungünstige Lebensumstände durch Einschränkung der Stoffwechselaktivität zu überdauern, wird von vielen marinen Invertebraten, darunter Schwämmen, Bryozoen oder Hydrozoen genutzt (RYLAND 1979, TURON 1992). Auch bei koloniebildenden Ascidien wurden Regressionsformen beobachtet (BERRILL 1951, BURIGHEL et al. 1976, MILLAR 1971). Es ist anzunehmen, daß der bei *C. dellechiaiei* beobachtete Verschluß der Tunikakanäle und –öffnungen ebenfalls mit einer Reduktion des Zooidstoffwechsels einhergeht. Als auslösender Faktor könnten hierbei erhöhte Wassertemperaturen wirken, da geschlossene Öffnungen sowohl bei freilebenden Tieren nach ungewöhnlichen Wärmeperioden (im Juli 2000), als auch bei transportierten und gehälterten Tieren beobachtet wurden. Andere Faktoren, wie z.B. erhöhte Aufwuchsdichte, fehlende Strömung etc. sind als Auslöser aber ebenfalls denkbar, konnten aber mit dem angewendeten Methodenrepertoire nicht genauer erfaßt werden.

Bei der koloniebildenden, im Verbreitungsgebiet von *C. dellechiaiei* heimischen Ascidienart, *Polysyncraton lacazei* wurden Veränderungen der Tunika beobachtet, die den in der vorliegenden Arbeit bei *C. dellechiaiei* dargestellten sehr ähnlich sind: Verschluß der Ein- und Ausströmöffnungen, Einstellung der Nahrungsaufnahme und Ausbildung einer durchgehenden Oberflächenschicht (TURON 1992). Es kommt dabei zu Umbauvorgängen in den Zooiden: Thoraxgewebe werden kontrahiert und der Verdauungstrakt zurückgebildet (MILLAR 1971, BURIGHEL et al. 1976, BURIGHEL und SCHIAVINATO 1984, TURON 1992). Bei *P. lacazei* dauern die Regressionszustände nur jeweils zwei bis vier Wochen an, aus den Abbauprodukten des alten Thoraxgewebes wird ein neuer Thorax herangebildet und die Kolonien nehmen ihre normale Stoffwechseltätigkeit wieder auf. Die Regressionsformen bei *P. lacazei* werden daher als Erneuerungsprozesse gedeutet, die den Zooiden ermöglichen, das am stärksten durch andauernde Aktivität und Stoffwechselendprodukte belastete Organ, den Kiemendarm, zu regenerieren.

Bei *C. dellechiaiei* konnte jedoch, auch nach mehreren Monaten, keine Wiederaufnahme der Nahrungsaufnahme beobachtet werden. Darüber hinaus betraf die Regression stets sämtliche Kolonien einer „Aquariumspopulation“. Daraus läßt sich schließen, daß die Überdauerungsformen bei *C. dellechiaiei* durch den Transport und Veränderungen des Umgebungsmilieus induziert werden. Die rasche Reaktion des Tunikagewebes beim Verschluß der Öffnungen (Umbauprozesse finden innerhalb weniger Stunden statt !) zeigt jedoch, daß die Tunika ein hochdynamisches System ist, das den Zooiden auch bei plötzlichen Umweltveränderungen optimalen Schutz gewährt.

#### 4.4 Toxische Farben – Pigmentzellen bei *C. dellechiaiei*

In Abschnitt 4.1 wurde bereits deutlich, daß Pigmentzellen offensichtlich protektive Funktionen bei der Abwehr von Fraßfeinden erfüllen. Da die Kolonien weder eine eindeutige Tarnfärbung, noch eine leuchtende Signalfarbe besitzen (Tafel 10), ist eine überwiegend optisch-kommunikative Funktion der Pigmente unwahrscheinlich. Eine zweite mögliche Funktion von Pigmenten in Organismen ist der Schutz vor schädigender Strahlung (UV-Protektion). Bei der Ascidie *Phallusia nigra* sind z.B. durch unterschiedliche Lichtexposition entstandene Färbungstypen beschrieben worden: Individuen im Starklicht sind dunkelbraun bis schwarz, im Dunkeln lebende Tiere weiß (HIROSE 1999). Bei *C. dellechiaiei* sind jedoch alle Kolonien gleich stark gefärbt, unabhängig vom Standort (Tafel 10).

In der Arbeitsgruppe STEFFAN (Institut für Organische Chemie, LMU München) konnten cytotoxische Pyridoacridinalkaloide als Hauptpigmente aus violetten Kolonien von *C. dellechiaiei* isoliert werden (größtenteils Shermilamin B und Kuanoniamin D, STEFFAN et al. 1993). Der grüne Farbstoff der graugrünen Kolonien ist bisher unbekannt, es könnte sich aber auch hierbei um ein Pyridoacridinalkaloid handeln (STEFFAN, pers. Mitteilung).

Der im Lichtmikroskop sichtbare charakteristische Farbumschlag der Pigmentkörner violetter Kolonien von rot nach gelb bei schwach saurem und neutralem pH-Wert (Tafel 28) läßt darauf schließen, daß die cytotoxischen Pyridoacridinalkaloide in den Pigmentzellen lokalisiert sind. Vermutlich treten also bei *C. dellechiaiei* die toxischen Eigenschaften der abgelagerten Pigmente in den Vordergrund: Die Alkaloide könnten als Fraßschutz wirken.

Optimaler Fraßschutz wird erreicht, wenn das toxische Pigment weit in der Tunika verteilt wird, um alle Bereiche der Kolonie zu schützen. Dies wird bei *C. dellechiaiei* durch die große Zahl der Pigmentzellen in der Tunika bewerkstelligt (Tafel 56). Die Schutzwirkung wird noch dadurch erhöht, daß Pigmentzellen gehäuft in Bereichen stärkerer Exposition gegenüber der Umgebung (Außenschichten, Wände der Tunikakanäle) auftreten (Tafeln 22 und 56).

Die chemischen Eigenschaften der Pyridoacridinalkaloide bestimmen offensichtlich auch die Form der Speicherstrukturen in den Pigmentzellen. Alle Pigmentzellen von *C. dellechiaiei* lassen sich auf einen Grundtyp zurückführen: eine große, vakuolisierte Zelle mit wenig Cytoplasma, deren „Vakuole“ netzwerkartig verlaufende Fibrillen und Körner enthält<sup>2</sup> (Tafeln 27, 29, 36).

Zunächst muß die Ablagerung in einem vom Zellkern abgegrenzten Kompartiment erfolgen, da die Pyridoacridinalkaloide DNA-Interkalatoren sind, sich zwischen benachbarte Basenpaare einschieben und dadurch die Struktur der DNA verändern (Tabelle 1). Aufgrund dieser Interaktion bietet sich die Speicherung in der Vakuole an.

<sup>2</sup> Anmerkung: Die Bezeichnung „Körner“ wurde aufgrund ihrer Elektronendichte im TEM gewählt. Aussagen über den Aggregatzustand können hier nicht gemacht werden, die Bezeichnungen „Pigmenttropfen“ oder „Pigmentkörperchen“ hätten ebenso ihre Berechtigung.

Pyridoacridinalkaloide sind schlecht wasserlöslich, schlecht löslich in Triglyceriden, lösen sich aber in Methanol (vgl. Tabelle 1). Ansäuern mit Schwefelsäure verbessert die Wasserlöslichkeit etwas (STEFFAN und ESTERMEIER, persönliche Mitteilungen). Aufgrund dieses Lösungsverhaltens wäre es auch im lebenden Organismus nicht möglich, die Pigmente in wäßrigen Lösungen beliebig hoch anzureichern. Für einen effektiven Schutz der Zooide vor Fraßfeinden müßte das Pigment aber in großen Mengen in den oberen Tunikaschichten konzentriert werden.

Durch Schwefelsäure, wie sie auch in Vakuolen der Tunikazellen von *C. dellechiaiei* nachgewiesen werden konnte, läßt sich zwar etwas mehr Pigment in Lösung bringen, die Konzentration des gelösten Farbstoffes ist aber dennoch gering (sehr helle Farbe der Lösung, s. Tafel 28). Zur Anreicherung größerer Pigmentmengen auf geringem Raum wird wahrscheinlich eine schwächer polare Umgebung benötigt. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen an Pigmentzellen bestätigen, daß die Pigmente in Pigmentkörnern lokalisiert sind und nicht frei in der Vakuole gelöst vorliegen. Dadurch können viel größere Mengen der Farbstoffe in der Vakuole gespeichert werden, als durch Lösung des Alkaloids in der wäßrigen Phase: Pigmentkörner sind viel intensiver gefärbt als die umgebende Vakuolenflüssigkeit (Tafel 27).

Neben Wasser bzw. Säure und Pigmentkörnern konnte ultrastrukturell noch eine dritte Strukturkomponente in den Vakuolen der Pigmentkörner identifiziert werden: Feingranuläre und –fibrilläre Strukturen, die die Netzwerkfibrillen, die Auflagerung an der Innenseite des Tonoplasten und die Außenschicht der Pigmentkörner bilden (Tafeln 31, 32). Im Folgenden werden diese vereinfacht als Netzwerksubstanzen bezeichnet.

Die chemische Zusammensetzung dieser Netzwerksubstanzen ist unbekannt. Offensichtlich sind sie an der Ablagerung der Pigmente direkt beteiligt. Da sie nicht nur die Netzwerkfibrillen selbst, sondern auch die Randschichten der Pigmentkörner bilden, trennen sie das hydrophobe Pigment von der wäßrigen Umgebung ab und ermöglichen so die Speicherung großer Pigmentmengen in der hydrophilen Vakuole (Tafeln 31, 32).

Vergleichbare Vorgänge können auch in anderen biologischen Systemen beobachtet werden. Ganz ähnlich verläuft z.B. die Entstehung der „*lipid bodies*“ in Pflanzenzellen (WANNER et al. 1981). In den mittleren, lipophilen Bereichen einer Elementarmembran (= Phospholipiddoppelschicht) des ER sammeln sich Triglyceride und bilden so kugelförmige *lipid bodies*. Die Grenzschicht zum wässrigen Cytoplasma wird hier von einer „*half unit membrane*“ (= halbe Elementarmembran, WANNER et al. 1981) gebildet (Öl-in-Wasser-Emulsion).

In den Chromoplasten werden hydrophobe Carotinoide im hydrophilen Stroma verteilt gehalten. Dies wird durch amphipolare Phospholipide ermöglicht, die die in Lipiden gelösten Pigmentmoleküle umschließen. Die hydrophile Seite der Phospholipide zeigt zum wäßrigen Stroma der Chromoplasten hin, während die lipophile Seite ins Innere des Pigmenttröpfchens weist. Die Phospholipide bilden also eine Grenzschicht, die die Speicherung lipophiler Substanzen im wässrigen Stroma erlaubt. Je nach Verfügbarkeit der amphiphilen Phospho-

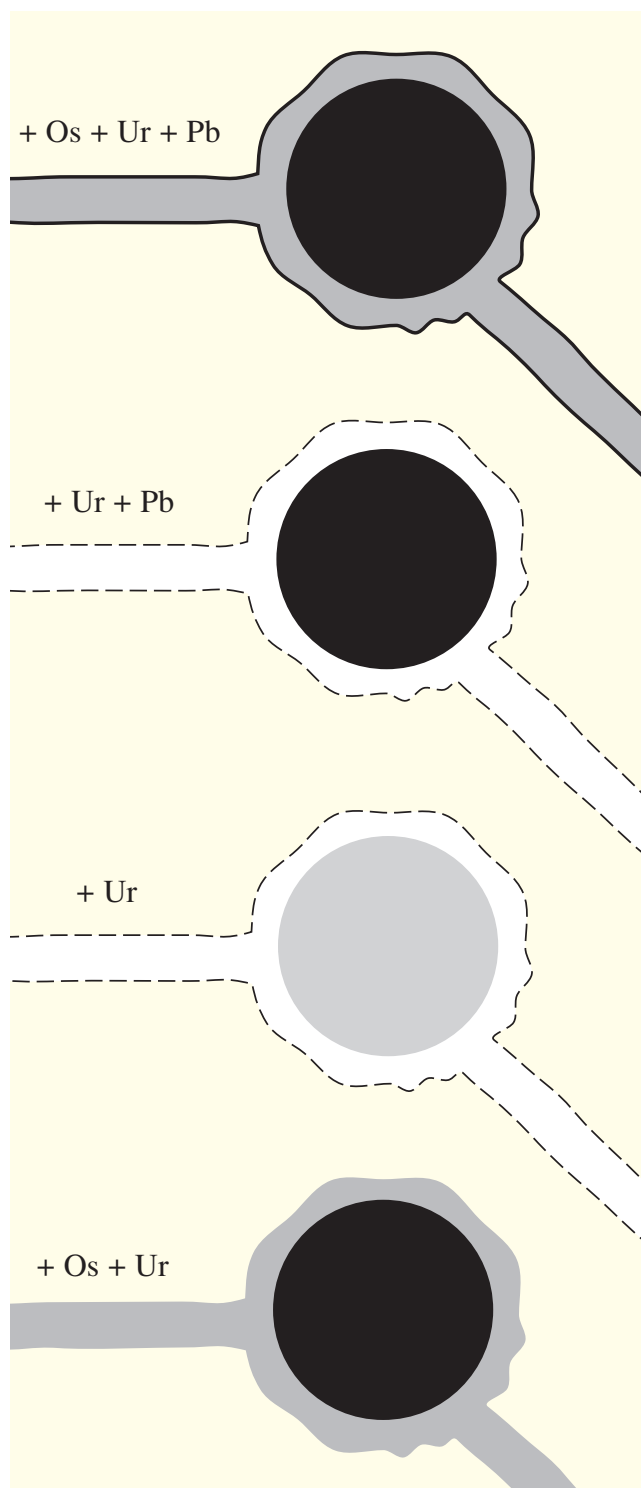


lipide bilden sich durch Selbstorganisation globuläre, lamelläre oder tubulöse Strukturen aus, in denen die Pigmente gespeichert werden (SITTE et al. 1991; WANNER, pers. Mitteilung).

Der Unterschied zwischen diesen Speicherformen und der Anreicherung von Pigmenten in den Pigmentzellen von *C. dellechiaiei* besteht darin, daß bei Pigmentkörnern von *C. dellechiaiei* die Grenzschicht als Umhüllung der Pigmentkörner deutlich dicker ist. Mit einer Stärke von 30–60 nm ist sie 10 bis 20x dicker als eine halbe Elementarmembran (Tafel 32, Abb. 1). Das Prinzip, wasserunlösliche Stoffe mit Hilfe von amphiphilen Mittels-substanzen (= Netzwerksubstanzen) in tubulösen oder sphärischen Strukturen in einem wäßrigen Zellkompartiment zu speichern, ist jedoch sowohl bei Pigmentzellen von *C. dellechiaiei* als auch bei *lipid bodies* und Chromoplasten verwirklicht.

Wahrscheinlich hängt die Ausbildung dieser Speicherstrukturen mit den physikochemischen Eigenschaften der Pigmentmoleküle zusammen. Die Pyridoacridinalkaloide sind nicht absolut unpolar (Löslichkeit in Methanol), sondern entsprechen in ihrer Polarität eher einem Phospholipidmolekül. Möglicherweise sind also die Kräfte, die eine Entmischung der wässrigen und der lipophilen Phasen in der Pigmentzelle bewirken, nicht so stark wie bei der Speicherung von Triglyceriden. Es stellt sich keine völlige Trennung der beiden Phasen mit strenger Orientierung der Phospholipidmoleküle ein, sondern es kommt zu einem Gleichgewicht zwischen wässriger Phase (mit geringen Mengen gelösten Pigments), amphiphiler Phase mit einem Gemisch aus Pigment und Phospholipid (Netzwerkfibrillen, Randbereich des Pigmentkorns) und reiner Pigmentphase (Kernbereich des Pigmentkorns).

Die Beteiligung von Phospholipiden am Aufbau der Netzwerksubstanzen ist aus zwei Gründen wahrscheinlich. Erstens konnte Phosphor direkt in den Pigmentkörnern und im Pigmentzellennetzwerk über die Elementanalyse im REM (EDX) nachgewiesen werden (Tafel 34). Zweitens reagieren die Netzwerksubstanzen offensichtlich mit Osmium, aber nur schwach mit anderen schwermetallhaltigen Kontrastierungsmitteln (s. Tafeln 33, 70). Diese charakteristische Reaktion deutet auf das Vorliegen ungesättigter Fettsäuren hin (PLATTNER und ZINGSHEIM 1987). Mit Hilfe der EDX-Methode konnte zwar gezeigt werden, daß auch die inneren Bereiche der Pigmentkörner osmiophil sind, doch im Unterschied zu den Netzwerksubstanzen lassen sich die inneren Bereiche der Pigmentkörner auch mit anderen Schwermetallen wie Uran oder Blei kontrastieren (s. Tafeln 33, 70). Wahrscheinlich wird diese Kontrastierung durch Anlagerung der Schwermetallatome in der „Bay-Region“ der Shermilamin-Moleküle (s. Tafel 3, Abb. 1) hervorgerufen (STEFFAN, pers. Mitteilung).

**Tafel 70****Kontrastierung der Pigmentkörner und Netzwerkfasern in den Pigmentzellen**

Abhängig von den verwendeten Kontrastierungsmitteln werden Pigmentkörner und Netzwerkfasern unterschiedlich elektronendicht dargestellt. Während der Innenbereich des Pigmentkorns sowohl mit Osmiumtetroxid, als auch mit Uranylacetat oder Bleicitrat kontrastiert werden kann, reagieren Netzwerkfasern und Randschichten der Pigmentkörner vor allem mit Osmiumtetroxid. Diese spezifische Reaktion könnte durch Phospholipide in den Netzwerkfasern hervorgerufen werden. Schematische Darstellung nach TEM-Aufnahmen (vgl. Tafel 33).

Basierend auf den ultrastrukturellen und lichtmikroskopischen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann ein Vorschlag für die Bildung der Strukturen innerhalb der Pigmentzellenvakuole aufgestellt werden (schematische Darstellung s. Tafeln 71 und 72).

Folgende Schritte könnten zur Ausbildung der beobachteten Strukturen führen und auf diese Weise die Ablagerung großer Pigmentmengen ermöglichen:

### **1. Bildung der elektronendichten Auflagerung am Tonoplasten (Tafel 71)**

Aus dem Cytoplasma der Pigmentzelle werden Netzwerksubstanzen und Pigmentmoleküle (bzw. Vorstufen) in die Vakuole transportiert. Es bildet sich eine osmiophile Wandschicht am Tonoplasten aus.

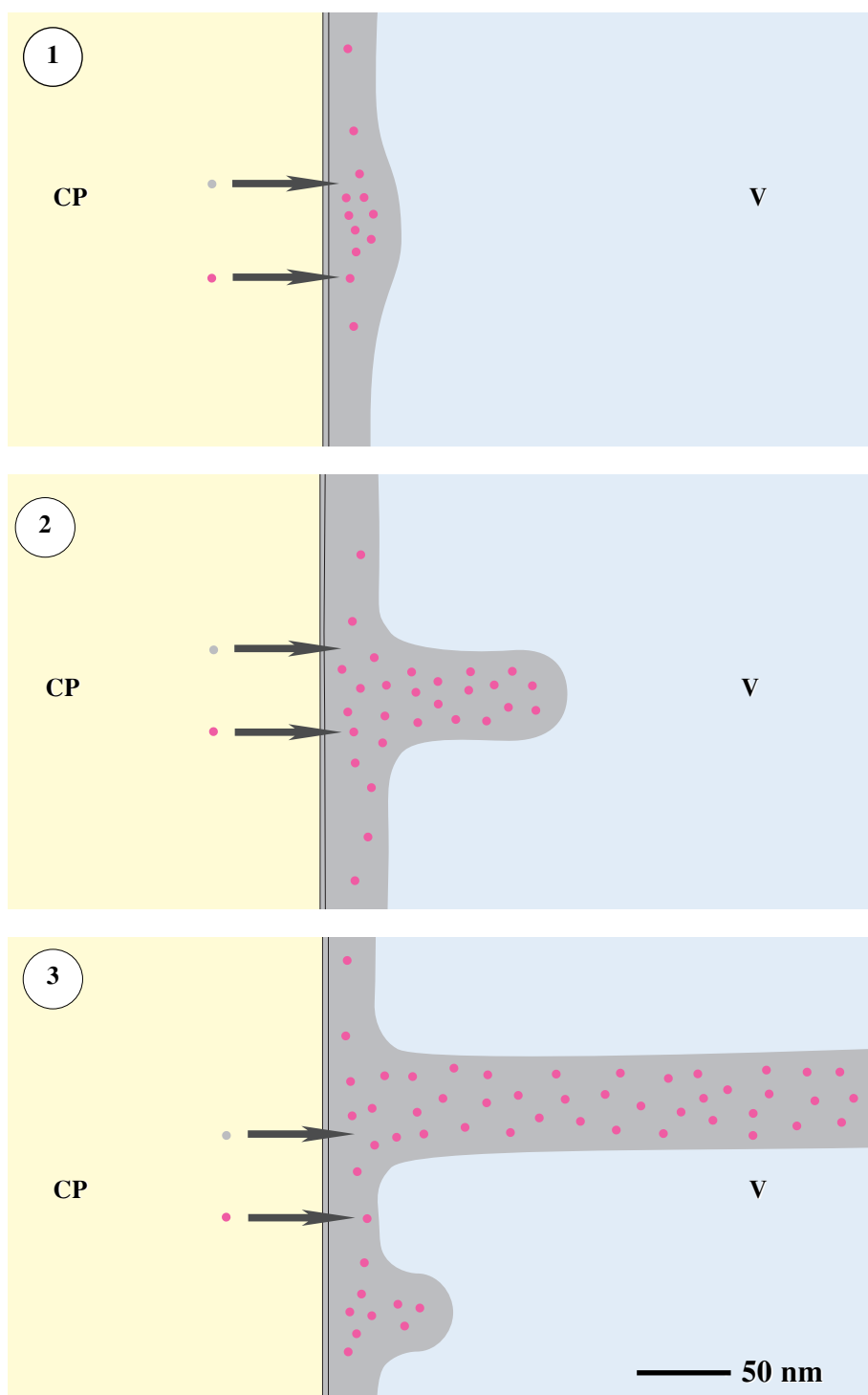
### **2. Bildung der Netzwerkfibrillen (Tafel 71)**

Die Netzwerkfibrillen entstehen vermutlich aus lokalen Aufwölbungen des elektronendichten Belags an der Tonoplasteninnenseite. Durch weitere Materialproduktion und -konzentration in diesen Bereichen können sich an der Innenseite des Tonoplasten proliferierende fibrilläre Strukturen ausbilden. Durch Selbstorganisation (hydrophobe Interaktion der Netzwerksubstanzen in der wässrigen Umgebung) entstehen drehrunde Netzwerkfibrillen, die offensichtlich fusionieren können.

### **3. Bildung der Pigmentkörner (Tafel 72)**

Da Netzwerkfibrillen in allen Pigmentzellen beobachtet wurden, unabhängig von der Anzahl der Pigmentkörner in diesen Zellen, werden die Netzwerkfibrillen vermutlich zuerst gebildet. An ihnen entstehen dann durch Ansammlung von Pigment in bestimmten Bereichen (z.B. hohe lokale Pigmentkonzentrationen an Fusionspunkten mehrerer Fibrillen) Pigmentkörner. Dies würde allerdings auch bedeuten, daß die Netzwerkfibrillen bereits Pigment enthalten. Die Anreicherung von reinem Pigment im homogen erscheinenden Kernbereich der Pigmentkörner beruht auf einer Zusammenlagerung gleichartiger Moleküle aus dem Molekülgemisch der Netzwerkfibrillen heraus, es kommt zur Entmischung.

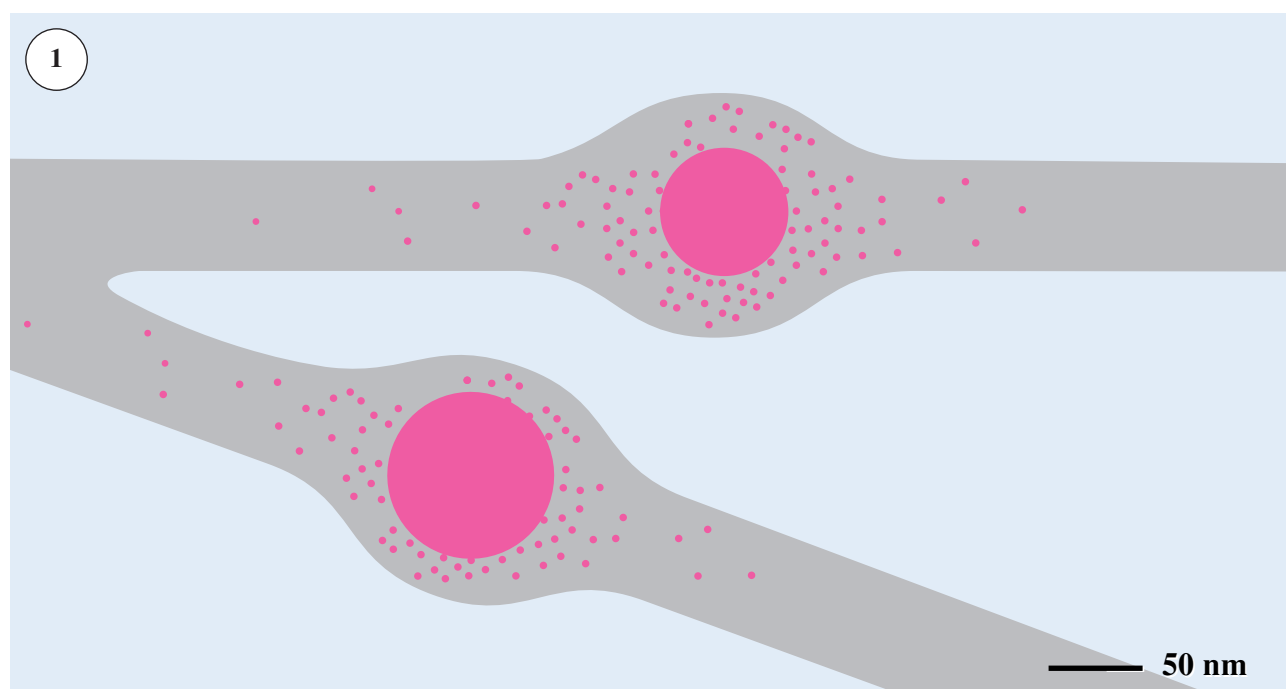
Die Größe der Pigmentkörner wird dabei von der Menge lokal vorhandener Pigmentsubstanz begrenzt. Ist die weitere Zufuhr von Pigment aus dem Cytoplasma über die Netzwerkfibrillen nicht gewährleistet, kann das Pigmentkorn nicht weiter vergrößert werden. Pigmentarme Bereiche in Netzwerkfibrillen stellen „Versorgungshindernisse“ dar. Dies erklärt auch die Ausbildung vieler kleiner Pigmentkörner (Tafel 29) in Pigmentzellen: Bei der raschen Aggregation und Abkugelung der Pigmentkörner wird Pigment aus den umgebenden Netzwerkfibrillen „abgesaugt“, es entstehen pigmentfreie Bereiche, die die einzelnen Bildungszentren für Pigmentkörner voneinander trennen. In der unmittelbaren Nähe zum Tonoplasten kann jedoch länger Pigment nachgeliefert werden, so daß es hier, im Randbereich des Pigmentballens, zur Ausbildung größerer Pigmentkörner kommen kann (Tafel 27; Tafel 30, Abb. 1).

**Tafel 71**

Schematische Darstellungen zur Bildung der Netzwerkfasern (CP = Cytoplasma, V = Vakuole)

1. Lokal stärkere »Anlieferung« von Material aus dem Cytoplasma führt zur Aufwölbung der Wandschicht am Tonoplasten.
2. Weitere Vesikel aus dem Cytoplasma verschmelzen mit dem Tonoplasten und geben ihren Inhalt an die Vakuole ab. Ob bereits Netzwerksubstanzen, Pigmente oder nur deren Vorstufen in die Vakuole abgegeben werden, ist unbekannt.
3. Bei weiterer Proliferation bilden sich Netzwerkfibrillen.





### Tafel 72

#### Bildung der Pigmentkörner

1. Bildung von Pigmentkörnern innerhalb der Netzwerkfibrillen durch Entmischung von Pigment und Netzwerksubstanzen. Durch Aggregation von Pigmentmolekülen entstehen Pigmentkörner.
2. Vergrößerung der Pigmentkörner durch Zufluß von Pigment aus den Netzwerkfibrillen bzw. durch Fusion von zwei Körnern.

Ein Indiz für die starke Aggregationstendenz der Pigmente ist die häufig beobachtete Fusion mehrerer Pigmentkörner (Tafel 31; Schema s. Tafel 72), die zur Vergrößerung der homogenen Kernbereiche führt.

Einen Nachweis für die rasche Zusammenführung vieler Pigmentkörner stellen die von zahlreichen Hohlräumen durchsetzten Pigmentkörner der Larven-Pigmentzellen dar (Tafel 66). Diese Hohlräume bilden sich wahrscheinlich durch gleichzeitige Fusion zahlreicher kleinerer Pigmentkörner. Während des Fusionsvorganges werden wässrige Bereiche zwischen einzelnen Pigmentkörnern eingeschlossen und bleiben im entstehenden großen Pigmentkorn als kugelförmige Hohlräume erhalten (Tafel 66).

Die verschiedenen Typen von Pigmentzellen, die in violetten und grünen Kolonien beobachtet wurden, können als unterschiedliche zeitliche oder physiologische Zustände gedeutet werden, die Pigmentzellen einnehmen können.

**1. Grundtyp** (Tafel 27, Abb. 1; Tafel 29)

Diese Pigmentzellen haben viele kleine bis mittelgroße Körner, die mit vielen glatten Netzwerkfibrillen verbunden sind. Hier herrscht offensichtlich ein Gleichgewicht zwischen Pigment und Netzwerksubstanzen. Dieser Typ ist bei violetten und grünen Kolonien die häufigste Variante, vermutlich handelt es sich um eine „optimierte“ Form der Pigmentspeicherung.

**2. Grundtyp mit großen Pigmentkörnern** (Tafel 27, Abb. 2)

Diese Zellen enthalten mehrere größere Pigmentkörner. Zu diesem Erscheinungsbild kommt es vermutlich bei einer starken Produktion von Pigment bei geringerer Produktion von Netzwerksubstanzen. Da wenige größere Körner eine geringere Oberfläche besitzen als viele kleine, wird mit weniger Netzwerkmaterial eine lückenlose Umkleidung der homogenen Kernbereiche des Kornes erreicht.

**3. Polyjunktionaler Grundtyp** (Tafel 37, Abb. 1)

Hier kommt es zu einem Überschuß an Netzwerksubstanzen. Neue Fibrillen werden gebildet und bereits bestehende Fibrillen verlängert. Aus Raummangel kommt es zur Ausbildung geknickter Fibrillen, aufgrund der erhöhten Fibrillenzahl sind Kontakte zwischen Fibrillen und Pigmentkörnern häufiger.

**4. Agranulärer Typ** (Tafel 37, Abb. 3)

Diese Variante wurde nur bei grünen Kolonien beobachtet (REM). In diesen Zellen herrscht wiederum ein starker Überschuß an Fibrillenmaterial, während nur wenige kleine Pigmentkörner zu beobachten sind. Da in der Vakuole Pigmentzellen der grünen Kolonien stets auch größere Mengen an gelöstem Pigment vorliegen (Färbung!, s. Tafel 35), ist die Aggregationsneigung des grünen Pigments vermutlich geringer bzw. die Wasserlöslichkeit höher als bei Shermilamin und Kuanoniamin. Agranuläre Pigmentzellen könnten aber auch entstehen, wenn zwar Netzwerksubstanz gebildet wird, die Anlieferung von Pigmenten aus dem Cytoplasma aber aus

physiologischen Gründen spärlich ist bzw. ganz unterbleibt. Im Falle einer späteren Pigmenteinschleusung in die Vakuole könnten aus diesen Zellen Grundtyp-Zellen werden.

Bei roten und bei grünen Pigmentzellen konnte nachgewiesen werden, daß die Vakuolen lebender Zellen starke Säuren enthalten (Tafel 28). Da die Blaszellen Schwefelsäure in großen Mengen enthalten, wie aus der Analyse intakter Blaszellen und abgesaugter Tunikaflüssigkeit ersichtlich wurde (Tafeln 17, 26), ist es wahrscheinlich, daß auch in Pigmentzellen Schwefelsäure für den sauren pH-Wert der Vakuole verantwortlich ist.

Bisher ungeklärt bleibt, in welchen Zellen oder Zellkompartimenten die Pigmente gebildet werden. B. STEFFAN (Institut für Organische Chemie, LMU München) konnte zeigen, daß Planktonproben aus dem Habitat von *C. dellechiaiei* keine Pyridoacridinalkaloide enthalten. Daraus kann geschlossen werden, daß diese Pigmente nicht, wie es z.B. bei Carotinoiden häufig der Fall ist (TARDENT 1993), über die Nahrung aus dem Meerwasser aufgenommen werden. Pigmentzellen selbst sind die wahrscheinlichsten Kandidaten für die Bildung der Pigmente, jedoch konnten aufgrund des extrem schmalen Cytoplasmaraums der Pigmentzellen (Tafeln 27, 32, 33) bisher keine Zellorganellen nachgewiesen werden, die für die Synthese größerer Pigmentmengen verantwortlich sein könnten. Wenn Pigmentzellen aus granulären filopodialen Zellen entstehen (s. Abschnitt 4.5), könnte das Endoplasmatische Reticulum der granulären filopodialen Zellen zunächst an der Pigmentbildung beteiligt sein. Auch der Inhalt der elektronendichten Granula in granulären filopodialen Zellen (Tafel 40) könnte Bestandteile für Netzwerkfibrillen oder Pigmente liefern.

Bei bereits voll ausgebildeten Pigmentzellen sind enge Kontakte mit granulären filopodialen Zellen sehr häufig (Tafel 47). Darüber hinaus konnten transparente Vesikel und homogene Granula sowohl in Pigmentzellen, als auch in dicht anliegenden filopodialen Zellen nachgewiesen werden (Tafel 47). Obwohl direkter Vesikeltransport nicht beobachtet werden konnte, ist es wahrscheinlich, daß die Kontakte zwischen den beiden Zelltypen dem Stoffaustausch dienen. Filopodiale Zellen dienen möglicherweise u. a. dazu, die Pigmentzellen mit Material (z.B. Alkaloid-Vorstufen) zu versorgen und ermöglichen so ihre weitere Vergrößerung.

#### 4.5 Filopodiale Zellen: Vorläufer für andere Tunikazellen ?

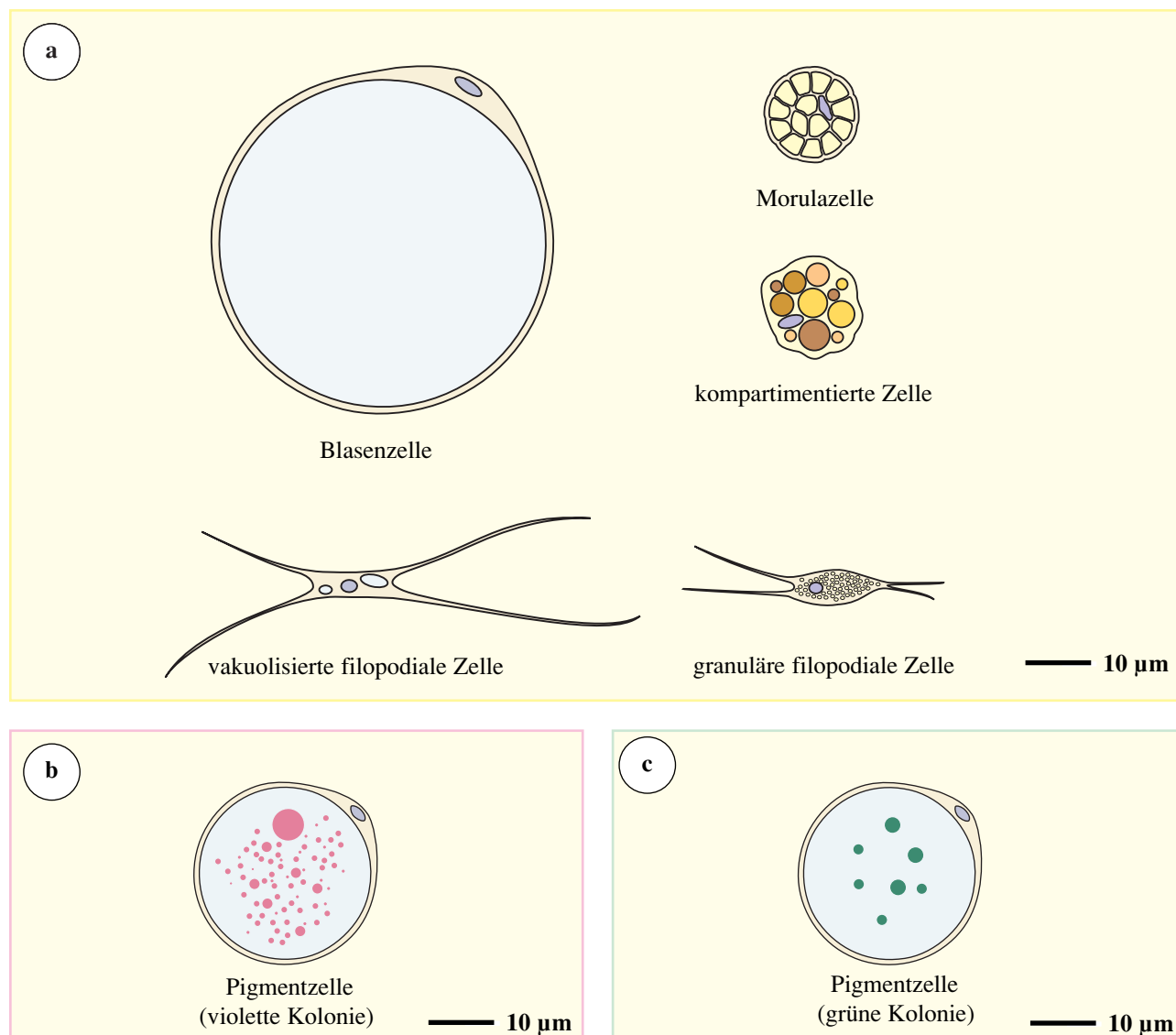
Filopodiale Zellen (granulärer und vakuolisierter Typ) sind der dritthäufigste Zelltyp in der Tunika von *C. dellechiaiei* (Tafel 56), sie konnten sowohl im Inneren der Zooide als auch in der Tunika der Kolonien und in der larvalen Tunika beobachtet werden (Tafeln 20, 38, 65). Es wurde gezeigt, daß filopodiale Zellen in der Lage sind, Bakterienzellen in der Tunika zu phagocytieren und zu verdauen (Tafeln 44, 58). Dies erklärt auch, warum besonders viele filopodiale Zellen in den Außenbereichen der Tunika sowie an den Wänden der Zooidräume und Tunikakanäle zu finden sind (Tafel 38). Hier wird durch die filopodialen Zellen vermutlich eine Art Abwehrnetz gebildet, das vorhandene Bakterien einfängt.

Gleichzeitig haben filopodiale Zellen offensichtlich auch Synthesefunktionen, worauf die zahlreichen elektronendichten Granula und elektronentransparenten Vesikel der granulären filopodialen Zellen und das aufgeweitete Endoplasmatische Reticulum hinweisen (Tafel 41). Die Art der synthetisierten Substanzen ist unbekannt. Die starke Kontrastierung der Granula läßt zunächst auf Lipide schließen (Tafel 40), allerdings sind sie nicht wie *lipid bodies* von einer halben Elementarmembran („*half unit membrane*“) begrenzt (WANNER et al. 1981). Da sie jedoch von einer (einfachen) Elementarmembran umgeben sind, die an vielen Stellen gewellt und vom elektronendichten Bereich abgehoben erscheint (Tafel 42), entsprechen sie im Aufbau *protein bodies* (WANNER, persönliche Mitteilung). Hierfür spricht auch die Anfärbbarkeit der Granula mit Eosin (Tafel 38), da proteinreiche Kompartimente häufig stark mit Eosin reagieren (WELSCH 1997).

Durch die Untersuchung der Larven konnte eine weitere, überraschende Beobachtung gemacht werden: Bei den filopodialen Zellen könnte es sich um Vorläufer für andere Tunikazellen handeln, da jeweils Übergangsformen zwischen filopodialen Zellen und Pigmentzellen und filopodialen Zellen und Blaszellen vorgefunden wurden (Tafel 65). Die Ähnlichkeit des Zellinhalts bei filopodialen Zellen und kompartimentierten Zellen ist sogar noch bei „ausgewachsenen“ Kolonien so groß, daß die Unterscheidung häufig sehr schwierig ist (Tafeln 41, 50). Vor allem bei TEM–Untersuchungen an Ultradünnschnitten werden die Filopodien aufgrund der sehr geringen Schnittdicke häufig nicht erfaßt (z.B. Tafel 40), die Zuordnung einer Zelle zum filopodialen oder kompartimentierten Typ kann dann aber noch über ihre Lage innerhalb der Tunika getroffen werden (kompartimentierte Zellen kommen nie in den oberen Tunikaschichten vor). In diesem Fall hatte es sich daher als sehr nützlich erwiesen, Proben aus unterschiedlichen Tunikaschichten sorgfältig getrennt zu präparieren und die genaue Lage der Proben im Tunikagewebe zu protokollieren.

Aufgrund der an der larvalen Tunika durchgeführten TEM–Untersuchungen kann ein Vorschlag für die Entstehung der Pigmentzellen, Blaszellen, kompartimentierten Zellen und der vakuolisierten filopodialen Zellen aus dem Grundtyp der granulären filopodialen Zellen aufgestellt werden (s. Tafel 74). Da filopodiale Zellen auch in den Zooiden von *C. dellechiaiei* vorgefunden werden, und sie vermutlich beweglich sind (Nachweis von Mikrofilamenten im Cytoplasma s. Tafel 45; Untersuchungen an anderen Ascidien vgl. IZZARD 1974), wandern sie wahrscheinlich aus den Zooiden in die Tunika und bilden in frühen Entwicklungsstadien der Larven die Grundpopulation der Tunikazellen. Evidenzen für



**Tafel 73**

Zelltypen in der Tunika von *C. dellechiaiei* - Schematische Darstellung

a. Zelltypen, die in Kolonien beider Farbvarianten nachgewiesen wurden.

b. Pigmentzelle einer violetten Kolonie (Grundtyp).

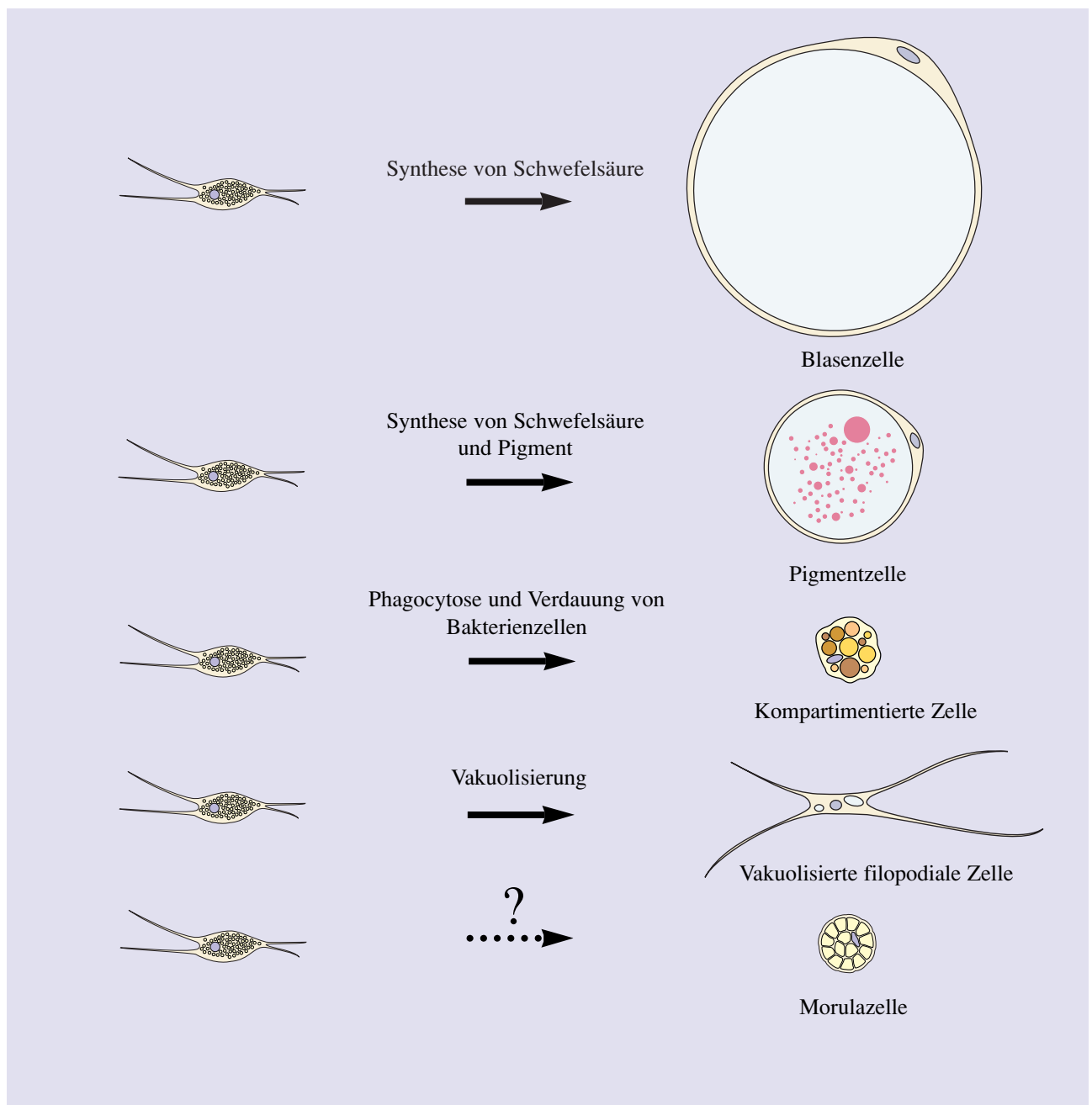
c. Pigmentzelle einer grünen Kolonie (Grundtyp).

die Abgabe von Zellen über die Epidermis in die Tunika konnten von HIROSE et al. (1996) bereits an *Clavelina miniata* aufgezeigt werden. Bei der anschließenden Umwandlung der (granulären) filopodialen Zellen in andere Tunikazellen können modellhaft folgende Schritte festgelegt werden, bei denen jeweils einzelne Funktionen der filopodialen Zellen in den Vordergrund treten (schematische Darstellung s. Tafel 74):

1. Vakuolisierung, Synthese von Schwefelsäure, Zellvergrößerung: Bildung der **Blasenzellen**
2. Vakuolisierung, Synthese von Schwefelsäure, Pigment und Netzwerksubstanzen und Ablagerung der Produkte in der Vakuole: Bildung der **Pigmentzellen**
3. Phagocytose von Bakterienzellen, Abbau der Bakterien im lytischen Kompartiment, ev. Speicherung daraus gewonnener Substanzen, Wanderung in die unteren Tunikaschichten: Entstehung der **kompartmentierten Zellen**
4. Synthese unbekannter Substanzen (und ev. deren Abgabe in die Tunikamatrix oder an andere Zellen): Entstehung der **vakuolisierten filopodialen Zellen**.  
Aus den vakuolisierten filopodialen Zellen könnten wiederum Blasen oder Pigmentzellen entstehen.

Hinweise auf eine Bildung der **Morulazellen** aus filopodialen Zellen konnten nicht gefunden werden, obwohl derartige Übergänge bei anderen Ascidien bereits vermutet wurden (HIROSE et al 1991). Für verschiedentlich gemachte Vorschläge, Morulazellen seien an der Produktion von Tunika–Matrixproteinen beteiligt (BURIGHEL und CLONEY 1997), konnten bei *C. dellechiaiei* keine eindeutigen Nachweise erbracht werden. Die relativ starke Kontrastierung der Vesikel mit Osmium und Uranylacetat (Tafeln 53, 55) und mit Eosin (Tafel 53) könnte jedoch auf Proteine in den Vesikeln hinweisen. Da nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob die Begrenzung der Granula der Morulazellen von einer halben oder einer ganzen Elementarmembran gebildet wird, könnten die Granula aber auch Lipide enthalten.

Auffällig ist die intensive Autofluoreszenz der Vesikel in den Morulazellen (Tafel 55). Sie entspricht der Autofluoreszenz der Tunichrome, allerdings kann dies allein aufgrund der geringen Spezifität von autonomen Fluoreszenzerscheinungen nicht als Nachweis für Tunichrom gewertet werden (vgl. TAYLOR et al. 1997). Vanadium und Eisen, Elemente, die bei Stolidobranchia häufig in Tunichrom-Komplexen vorkommen (TAYLOR et al. 1997), wurden bei der Elementanalyse der Morulazellen nicht nachgewiesen (Tafel 55). Da *C. dellechiaiei* den Aplousobranchia zuzuordnen ist, bekräftigt dieses Ergebnis die Vermutung, daß nur Stolidobranchia und Phlebobranchia Vanadium oder Eisen in großen Mengen aus dem Meerwasser anreichern (GOODBODY 1974, MILANESI und BURIGHEL 1978). Aufgrund ihrer Seltenheit (2% der Tunikazellen) wird angenommen, daß Morulazellen bei *C. dellechiaiei* zumindest im beobachteten „physiologischen Normalzustand“ nur eine untergeordnete Rolle in der Zellpopulation der Tunika spielen.

**Tafel 74**

Modellvorstellung zur Entstehung verschiedener Tunika-Zelltypen aus granulären filopodialen Zellen.

## 4.6 Kompartimentierte Zellen: Endlager oder Speicher ?

In nahezu allen kompartimentierten Zellen konnten ausgedehnte lysosomale Kompartimente beobachtet werden. Sie bestimmen wesentlich das Erscheinungsbild dieses Zelltyps (Tafel 50). Die Mehrzahl der Lysosomen in kompartimentierten Zellen enthält große Membranstapel (Tafeln 50, 51). Die Bildung solcher Membrankörper in Zellen ist ein bei vielen Organismen verbreitetes Phänomen. Sie kann nicht nur in Residualkörpern (= Lysosomen, die unverdauliches Material enthalten) vorgefunden werden (KLEINIG und SITTE 1992), sondern dient auch der Speicherung wichtiger Membranbestandteile wie Proteine oder Phospholipide (z.B. bei der Rotalge *Porphyridium cruentum*; WANNER und KÖST 1984), sowie zur Vergrößerung biologisch aktiver Oberflächen (z.B. bei *Escherichia coli*; ARECHAGA et al. 2000). Die Lage der kompartimentierten Zellen in Gruppen in den unteren Tunikabereichen (Tafel 49) läßt darauf schließen, daß kompartimentierte Zellen nicht unmittelbar am Tunikastoffwechsel beteiligt sind, sondern eher passive Speicherkompartimente darstellen. Da sie (abgesehen von den Zooiden, die ja keine Pyridoacridin-alkaloide enthalten) die einzigen gelb gefärbten Strukturen in den Kolonien sind, könnten sie das Ascididemin, ein gelbbraunes Pyridoacridinalkaloid aus *Cystodytes dellechiaiei* (s. Tabelle 1), enthalten. Dies muß in weiteren Untersuchungen, z.B. durch gezielte Extraktion von Alkaloiden aus den unteren Tunikabereichen, überprüft werden.

Auffällig ist bei kompartimentierten Zellen die Anreicherung von strukturell einheitlichen, offensichtlich unverdauten Gram-positiven Bakterien bis zu Zelldichten von  $10^{11}$  Bakterien/ml (Abschnitt 3.4.2; Tafel 57, Abb. 1). Hohe intrazelluläre Dichten von intakten Bakterien könnten prinzipiell auf drei verschiedenen Wegen entstehen:

1. Bakterien werden phagocytiert, können oder sollen aber nicht verdaut werden. Es kommt zu einer intrazellulären Anreicherung intakter Bakterienzellen.
2. Bakterien teilen sich in der Tunikamatrix und treten lokal in hohen Dichten auf. Große Mengen an Bakterienzellen werden gleichzeitig phagocytiert.
3. Bakterien teilen sich innerhalb der kompartimentierten Zellen.

Die Entstehung der hohen Bakteriendichten durch Phagocytose einzelner Bakterienzellen (Weg 1) ist relativ unwahrscheinlich, da in diesem Falle vereinzelte Bakterien in eigenen Vesikeln im Cytoplasma zu erwarten wären. Die teilweise sehr regelmäßige Packung der Bakterien in den kompartimentierten Zellen deutet eher auf die zweite oder dritte Möglichkeit hin. Diese beiden Entstehungswege setzen voraus, daß sich Bakterien –extra- oder intrazellulär– innerhalb der *Cystodytes*-Kolonien teilen. Möglich wäre sowohl eine parasitäre als auch eine symbiontische Beziehung zwischen kompartimentierten Zellen und Bakterien. Nachweise für Beziehungen dieser Art sind allerdings sehr schwer zu erbringen. Antibiotikabehandlung von *C. dellechiaiei*-Kolonien und anschließende ultrastrukturelle Untersuchung könnten Informationen über eventuelle Symbiosen liefern, angesichts der Regression der Kolonien im Aquarium, der eingestellten Nahrungsaufnahme und der geringen Verfügbarkeit lebender Tiere wurden Versuche in dieser Richtung aber einstweilen zurückgestellt. Noch zu klären ist, ob gespeicherte Substanzen wie granuläres Material und Membrankörper in den kompartimentierten Zellen aus der Zersetzung phagocytierter Bakterien stammen.



## 4.7 Bakterien in der Tunika

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, ist es schwierig, Nachweise für symbiontische Beziehungen zwischen eukaryontischen Gewebezellen und Mikroorganismen zu erbringen. Bei einigen Ascidien konnten bereits Symbiosen mit Cyanobakterien nachgewiesen werden (PARRY und KOTT 1988, HIROSE et al. 1996 und 1998, HIROSE 2000). Einige strukturelle Befunde in der Tunika von *C. dellechiaiei* deuten jedoch darauf hin, daß es sich bei den in der Tunika vorgefundenen Bakterien möglicherweise um Symbionten handeln könnte.

### 1. Vordringen von Bakterien in die Tunika

Obwohl an der Außenseite der Tunika frisch gesammelter Kolonien kaum Bakterien beobachtet wurden (Tafel 15), gelingt es offensichtlich einigen Bakterientypen, die Cuticula und die darauffolgende sehr dichte Matrixfaserschicht mit zahlreichen phagocytierenden filopodialen Zellen zu überwinden oder zu umgehen. Bei gehäuteten Kolonien, deren Außenseiten stark bewachsen sind, fällt auf, daß innerhalb der Tunika nur wenige Mikroorganismen vorkommen (Tafel 4).

Möglicherweise besitzen diese Bakterientypen spezielle Enzyme, die die Tunikamatrix lokal auflockern und dadurch eine Fortbewegung ermöglichen. Lokal hohe Zelldichten lassen darauf schließen, daß in der Tunika auch eine Vermehrung der Bakterien stattfindet (vgl. Abschnitt 4.6). Weitere Untersuchungen in dieser Richtung könnten Teilungsstadien nachweisen und damit das Wachstum der Bakterienpopulation in der Tunika belegen.

### 2. Gleichartigkeit und Zelldichte der in der Tunika vorgefundenen Bakterientypen

Die Zugehörigkeit der in der Tunika vorgefundenen Bakterienzellen zu wenigen „Bautypen“ läßt darauf schließen, daß nur bestimmte Bakterienarten in der Tunika wachsen können, bzw. toleriert werden (Tafeln 57, 58). Darüber hinaus wurden immer wieder die gleichen Bakterientypen in zu unterschiedlichen Jahreszeiten und an unterschiedlichen Tauchplätzen gesammelten Kolonien gefunden. Hierbei könnte es sich um einen infektiösen Vorgang handeln, bei dem spezialisierte Bakterien Strategien entwickelt haben, die Abwehrmechanismen der Tunika zu umgehen und dort zu siedeln. Möglich ist aber auch, daß bestimmte Bakterienarten aufgrund spezifischer Stoffwechselleistungen in der Tunika durchaus „erwünscht“ sind und als Symbionten toleriert werden. Dafür spricht auch, daß sich Bakterien offensichtlich innerhalb der Tunika teilen (s. Abschnitt 4.6) und hohe lokale Zelldichten erreichen.

### 3. Gezielte Aufnahme bestimmter Bakterienzellen durch Tunikazellen

Innerhalb der Tunika kommt es durch die filopodialen und kompartimentierten Zellen zur gezielten Aufnahme und Verdauung von Bakterien, wie an verschiedenen Phagocytosestadien gezeigt werden konnte (Tafeln 44, 58, 43). Auch dies kann sowohl ein Mechanismus zur Abwehr von Infektionen, als auch ein Anzeichen für symbiontische Beziehungen sein. Mikroorganismen könnten von der geschützten Lage

innerhalb der Tunika profitieren, während Tunikazellen durch die Verdauung eines Anteils der Bakterienpopulation erwünschte Nähr- oder Bausubstanzen gewinnen können. Ähnliche symbiontische Beziehungen sind für die Verdauung der Cellulose bei Wiederkäuern verantwortlich (CAMPBELL 1997), stellen aber auch z.B. bei mehreren Muschelarten der Tiefsee (FELBECK 1989, FIALA-MEDIONINI et al. 1989) einen erheblichen Teil der benötigten Nährstoffe. Eine Symbiose, die die Ernährung zumindest des Tunikagewebes unterstützt, könnte die lange Überlebensdauer der Kolonien im Aquarium und die konstante Aufrechterhaltung der Gewebe bei offensichtlich eingestellter Nahrungsaufnahme der Zooide erklären. Bei einigen Ascidien konnten bereits Symbiosen mit photosynthetischen Cyanobakterien nachgewiesen werden (HIROSE 2000, HIROSE et al. 1996 und 1998, PARRY und KOTT 1988).

#### 4. Vorkommen bestimmter Bakterientypen in inneren Schichten der larvalen Tunika

Ein sehr interessanter Befund im Bezug auf Symbiosen innerhalb der Tunika ist der Nachweis von strukturell einheitlichen Bakterienpopulationen im „*inner compartment*“ der larvalen Tunika (Tafel 63). Wenn Bakterien in die larvale Tunika einwandern würden, wären sie vor allem im „*outer compartment*“ nachweisbar, da dieses von außen die erste theoretisch besiedelbare Schicht ist. Das „*outer compartment*“ ist aber bei den Larven von *C. dellechiaiei* stets bakterienfrei (Tafel 63). Einwanderungssituationen, z.B. an Läsionen der Cuticula, konnten nicht beobachtet werden, daher wäre es denkbar, daß die Bakterien über die Larven an die nachfolgenden Generationen weitergegeben werden und daher nicht neu in die Tunika einwandern. Dies spricht ebenfalls für einen Symbiosecharakter der Bakterien-Ascidienbeziehung (vgl. HOLLAND und NEALSON 1978). Im „*inner compartment*“ sind nicht nur Bakterienzellen vorhanden, sondern auch mögliche eukaryontische Symbiosepartner, die filopodialen Zellen. Darüber hinaus stellt das „*inner compartment*“ die Schicht dar, aus der sich die spätere Tunika „*erwachsener*“ Kolonien entwickelt, die also bei der Metamorphose der Larven zum Zoid erhalten bleibt. Dies läßt darauf schließen, daß die Erhaltung der Bakterien in der Tunika unterstützt wird – wenn auch damit noch nicht geklärt ist, ob dies nur zum Vorteil der Bakterien oder zu „beiderseitigem Nutzen“ geschieht.

Die offensichtlich großen strukturellen Unterschiede zwischen den isolierten Bakterien (Isolate C1–C3) und den in der Tunika direkt nachgewiesenen Bakterienzellen (Typ A–C) lassen darauf schließen, daß die Bedingungen im künstlichen Medium nicht dem Milieu in der Tunikamatrix gleichzusetzen sind. Isolierte Zellen zeigen deutliche Pleomorphie. Aus diesem Grund können auch meist nur bedingt Aussagen darüber getroffen werden, welches Isolat mit welchem *in situ* gefundenen Bakterientyp gleichzusetzen ist. Aufgrund der Zellwandbauweise kommt für die aus *C. dellechiaiei* isolierten Bakterienstämme jedoch nur ein *in situ* vorgefundener Bakterientyp in Frage: Gram-negative Stäbchen des Typs B. Offensichtlich handelt es sich bei diesen in filopodialen Zellen und in der Tunikamatrix vorgefundenen Zellen nicht, wie die ultrastrukturellen Daten zunächst vermuten ließen, um eine einzige Bakterienart, sondern um mindestens drei verschiedene Arten (WIRTH, persönliche Mitteilung).

## 5. Ausblick

Die vorliegende Arbeit lieferte viele Basisdaten durch cytologische und ultrastrukturelle Bearbeitung der Ascidentunika von *C. dellechiaiei*. Doch aus jeder beantworteten Frage ergaben sich neue Fragestellungen, deren Untersuchung lohnend erscheint.

### **Lokalisation der Pigmentsynthese und des Ascididamins**

Zu Beginn weiterführender Untersuchungen sollte geklärt werden, ob ein Austausch von Material zwischen filopodialen Zellen und Pigmentzellen stattfindet und welche Stoffe ausgetauscht bzw. „geliefert“ werden. Möglicherweise könnten mit immunocytoologischen Techniken Transfervorgänge sichtbar gemacht und einzelne Zwischenstadien der Pigmentsynthese genauer lokalisiert werden. Gezielte Extraktion substratnaher Tunikagewebe könnte als Methode dienen, auch das Ascididamin in den Kolonien genauer zu lokalisieren.

### **Isolierung möglicher Symbionten**

Die Isolierung z.B. der in den kompartimentierten Zellen vorgefundenen Gram-positiven Bakterienzellen (Typ A) und deren weitere strukturelle und biochemische Untersuchung soll aufklären, ob es sich bei den betreffenden Bakterienzellen um Symbionten handelt. Antibiotikabehandlung lebender Kolonien und deren strukturelle und biochemische Untersuchung könnte Aufschluß über die Rolle der Bakterien im Tunikastoffwechsel geben.

### **Chemie der Tunikamatrix**

Ein wichtiger Punkt weiterer Untersuchungen ist die chemische Zusammensetzung der Tunika-Matrixfasern. Offensichtlich handelt es sich bei den Matrixfasern um einen sehr robusten „Bio-Komposit-Baustoff“. Möglicherweise liegen auch in diesem Baustoff verwertbare pharmakologische oder biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten (antikoagulative Funktion?; Säure/Laugen-Beständigkeit).

Die Vielfalt der Strukturen in der Tunikamatrix von *C. dellechiaiei* läßt erkennen, daß die Tunika ein vielseitiges Gewebe ist, das viele Eigenschaften der Bindegewebe von Wirbeltieren besitzt. Extrazelluläre und zelluläre Elemente bilden ein komplexes System, das offensichtlich in der Lage ist, auf Umwelteinflüsse schnell zu reagieren und auch bei eingeschränkter Nahrungsaufnahme durch die Zooide lange Zeit funktionsfähig zu bleiben. In der Tunika kommt es zum Zusammenspiel von zahlreichen Einzelorganismen (Zooiden), Geweben (Tunika- und Zooidgeewebe) und Einzelzellen (Interaktion zwischen Tunikazellen), darüber hinaus beherbergt die Tunika möglicherweise bakterielle Symbionten. Auf welchem Wege dieses Zusammenspiel gesteuert wird, ist noch unbekannt. Untersuchungen in dieser Richtung könnten neue Einblicke in kommunikative Prozesse zwischen verschiedenartigen Zelltypen geben.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde mit licht- und elektronenmikroskopischen Methoden die Tunika von *Cystodytes dellechiaiei* (Ascidacea, Aplousobranchia) histologisch und cytologisch untersucht. Diese koloniebildende Ascidie kommt in zwei Farbvarianten (violette und graugrüne Kolonien) im Mittelmeer vor. Beide Farbvarianten enthalten pharmakologisch interessante, intensiv farbige Pyridoacridinalkaloide. Bisher lagen allerdings noch keine Informationen darüber vor, in welchen Organen der Tiere diese Sekundärstoffe lokalisiert sind bzw. welche Zellen sie produzieren. Daher wurden zunächst die Gewebeelemente der Ascidie charakterisiert.

Eine mittelgroße Kolonie enthält ca. 100 Zooide, die vollständig in eine gemeinsame Tunika eingebettet sind. Die Tunika bildet mit über 98 % das Hauptvolumen der Kolonien, während Zooidgewebe nur einen Volumenanteil von 1,25 % ausmachen.

Die Kolonien werden nach außen von einer 70 - 100 nm dicken Cuticula abgeschlossen, darunter befindet sich eine subcuticuläre Schicht aus sehr dicht angeordneten Matrixfasern (Faserabstände < 0,5 µm).

Die Tunikamatrix besteht aus drehrunden Fasern (Ø 15-25 nm) die in Streutextur ein dichtes Geflecht bilden. Eine histochemische Analyse der Matrix zeigte, daß sie zu einem großen Teil aus Mukopolysacchariden aufgebaut ist.

Die Zooide liegen in individuellen, nach oben offenen Hohlräumen, die von einer dichten Schicht aus Matrixfasern ausgekleidet sind. Jedes Zooid besitzt zudem eine Kapsel aus überlappend angeordneten, scheibenförmigen Kalkschuppen. Die Zooide sind durch individuelle Kanäle mit der Meerwasserumgebung verbunden. Jeder Kanal besitzt an seinem distalen Ende eine sechslappige Öffnung aus Tunikagewebe, die geöffnet und verschlossen werden kann.

Die Tunika enthält sechs verschiedene Zelltypen: Blaszellen, Pigmentzellen, granuläre und vakuolierte filopodiale Zellen, kompartimentierte Zellen und Morulazellen.

Blaszellen besitzen eine große Vakuole (Ø ca. 60 µm), die mit Schwefelsäure (pH 1) gefüllt ist. Blaszellen bilden den Hauptanteil des Tunikavolumens.

In violetten Pigmentzellen konnten pharmakologisch aktive Pyridoacridinalkaloide (= violette Pigmente) nachgewiesen werden. Das Pigment der grünen Kolonien wurde chemisch bisher nicht identifiziert. Die cytotoxischen Stoffe werden über ein komplexes System aus Fibrillen und Pigmentkörnern in der Vakuole angereichert. Violette und grüne Pigmentzellen unterscheiden sich in Anzahl und Größe der Pigmentkörner, besitzen aber denselben Grundaufbau aus fibrillären und granulären Elementen innerhalb der Vakuole. Je nach physiologischem Zustand der Pigmentzellen kommen verschiedene Bautypen von Pigmentzellen vor: Oligojunktionale, polyjunktionale und agranuläre Pigmentzellen. Beim polyjunktionalen und agranulären Typ liegt eine Überproduktion an Netzwerkfibrillen vor, während der



oligojunktionale Typ ein ausgewogenes Verhältnis an Netzwerkfibrillen und Pigmentkörnern enthält. Die Mehrzahl der Pigmentzellen ist oligojunktional, daher wird dieser Typ auch als „Grundtyp“ bezeichnet.

Filopodiale Zellen haben mehrere lange cytoplasmatische Ausläufer, die netzwerkartig die Tunika durchziehen. Granuläre filopodiale Zellen enthalten zahlreiche eosinophile Granula mit verschieden elektronendichtem Inhalt. Vakuolisierte filopodiale Zellen besitzen keine oder nur sehr wenige Granula. Beide Typen der filopodialen Zellen phagocytieren in der Tunikamatrix vorkommende Bakterienzellen. In filopodialen Zellen wurden häufig große lysosomale Kompartimente nachgewiesen. Filopodiale Zellen könnten einen universalen Zelltyp darstellen, der aus den Zooiden in die Tunika einwandert und sich dort in die übrigen Tunkazelltypen umwandelt.

Kompartimentierte Zellen enthalten große lysosomale Kompartimente, die mit myelinartigen Membrankörpern und granulärem Material gefüllt sind. Die kompartimentierten Zellen enthalten häufig große Mengen an Bakterien des Typs A.

In der Tunika wurden darüber hinaus große Mengen an stäbchenförmigen Bakterienzellen drei verschiedener Strukturtypen (Typ A, B, C) nachgewiesen. Bakterienzellen des Typs A sind Gram-positive Stäbchen, Zellen der Typen B und C sind Gram-negativ. Filopodiale Zellen phagocytieren vor allem Bakterien des Typs B und C, während in kompartimentierten Zellen große Mengen an Bakterien des Typs A nachgewiesen werden konnten (intrazelluläre Bakteriendichten bis  $10^{11}$  Zellen/ml). Aus Tunikagewebe wurden drei verschiedene Bakterienstämme isoliert, kultiviert und mikroskopisch untersucht. Alle drei Stämme sind Gram-negativ und unbegeißelt, sind also wahrscheinlich dem in der Tunika nachgewiesenen Typ B zuzuordnen. Die Isolate bilden häufig pleomorphe Zellen aus, die meisten Zellen sind jedoch stäbchenförmig.

Die Tunika der Larven von *C. dellechiaiei* ist vierschichtig. Nur die innerste Schicht, das „*inner compartment*“ enthält granuläre filopodiale Zellen, Pigmentzellen und Blaszellen. Kompartimentierte Zellen und Morulazellen fehlen. Darüber hinaus enthält das *inner compartment* Mischformen zwischen granulären filopodialen Zellen und Blasen- bzw. Pigmentzellen und Ansammlungen stäbchenförmiger, Gram-negativer Bakterienzellen.

## 7. Literaturverzeichnis

- ABDEL-MALEK, E. T. (1951). Menthol relaxation of helminths before fixation. *J Parasitol* 37: 321.
- ABDERHALDEN, E., ZEMPLÉN, G. (1911). Partielle Hydrolyse der Tunicatencellulose. Bildung von Cellobiose. *Biol Chem Hoppe Seyler* 72: 58-62.
- ALBANO, R. M., MOURAO, P. A. S. (1983). Presence of sulfated glycans in ascidian tunic and in the body wall of a sea cucumber. *Biochim Biophys Acta* 760: 192-196.
- ANDERSON, R. G. W., ORCI, L. (1988). A view of acidic intracellular compartments. *J Cell Biol* 106: 539-543.
- ARECHAGA, I., MIROUX, B., KARRASCH, S., HUIJBREGTS, R., DE KRUIJFF, B., RUNSWICK, M.J., WALKER, J. E. (2000). Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase. *FEBS Lett* 482: 215-219.
- AZUMI, K., YOKOSAWA, H., ISHII, S. (1990). Halocyamines: Novel antimicrobial tetrapeptide-like substances isolated from the hemocytes of the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. *Biochemistry* 29: 159-165.
- BALLARIN, L., CIMA, F., SABBADIN, A. (1994). Phagocytosis in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev Comp Immunol* 18(6): 467-481.
- BALLARIN, L., CIMA, F., SABBADIN, A. (1995). Morula cells and histocompatibility in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Zool Sci* 12(6): 757-764.
- BAVINGTON, C. D., MCKENZIE, J. D., PAGE, C., LEVER, R. (1999). Surface active proteoglycan secretions from marine invertebrates and their role in modulating biofouling. Annual Report of the Scottish association for Marine Science, Dunstaffnage Marine Laboratory (1998-1999): 20.
- BECERRO, M. A., TURON, X., URIZ, M. J. (1997). Multiple functions for secondary metabolites in encrusting marine invertebrates. *J Chem Ecol* 23(6): 1527-1547.
- BENSLIMANE, A. F., POUCHUS, Y. F., LE BOTERFF, J., VERBIST, J. F. (1988). Substances Cytotoxiques et Antibactériennes de l'Ascidie *Aplidium antillense*. *J Nat Prod* 51(3): 582-583.
- BERRILL, N. J. (1950). The Tunicata (with an account of the British species), London; Ray Society.

- BERRILL, N. J. (1951). Regeneration and budding in tunicates. *Biol Rev* 26: 456-475.
- BONNARD, I., BONTEMPS, N., LAHMY, S., BANAIGS, B., COMBAUT, G., FRANCISCO, C., COLSON, P., HOUSSIER, C., WARING, M. J., BAILLY, C. (1995). Binding to DNA and cytotoxic evaluation of ascididemin, the major alkaloid from the Mediterranean ascidian *Cystodytes dellechiaiei*. *Anti Cancer Drug Des* 10(4): 333-346.
- BONTEMPS, N., BONNARD, I., BANAIGS, B., COMBAUT, G., FRANCISCO, C. (1994). Cystodamine, a new cytotoxic fused polyaromatic alkaloid from the Mediterranean ascidian *Cystodytes delle chiajei*. *Tetrahedron Lett* 35(38): 7023-7026.
- BÖCK, P. (1989). *Romeis Mikroskopische Technik*. München, Wien, Baltimore, Urban und Schwarzenberg.
- BURIGHEL, P., BRUNETTI, R., ZANIOLO, G. (1976). Hibernation of the colonial ascidian *Botrylloides leachi* (Savigny): Histological observations. *Boll zool* 43: 293-301.
- BURIGHEL, P., MILANESI, C., SABBADIN, A. (1983). Blood cell ultrastructure of the ascidian *Botryllus schlosseri* L. II. Pigment cells. *Acta Zool* 64(1): 15-23.
- BURIGHEL, P., SCHIAVINATO, A. (1984). Degenerative regression of the digestive tract in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* (Pallas). *Cell Tissue Res* 235: 309-318.
- BURIGHEL, P., CLONEY, R. A. (1997). Urochordata: Ascidiacea. *Microscopic anatomy of invertebrates*. **15**: 221-347. F. W. Harrison. New York, Wiley-Liss.
- BURTON, R. F. (1983). The composition of animal cells: solutes contributing to osmotic pressure and charge balance. *Comp Biochem Physiol* 76 B(4): 663-671.
- CAMPBELL, N. A. (1997). *Biologie*. Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.
- CARROLL, A. R., COORAY, N. M., PIONER, A., SCHEUER, P. J. (1989). A second shermilamine alkaloid from a tunicate *Trididemnum* spec. *J Org Chem* 54: 4231-4232.
- CARROLL, A. R., SCHEUER P. J. (1990). Kuanoniamines A, B, C and D: Pentacyclic alkaloids from a tunicate and its prosobranch mollusk predator *Chelynotus semperi*. *J Org Chem* 55: 4426-4431.
- CASSARO, C. M. F., DIETRICH, C. P. (1977). Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. *J Biol Chem* 252(7): 2254-2261.

- CHIBA, K., HOSHI, M., ISOBE, M., HIROSE, E. (1998). Bioluminescence in the tunic of the colonial ascidian, *Clavelina miniata*: Identification of luminous cells in vitro. *J Exp Zool* 281: 546-553.
- CIMA, F., BALLARIN, L., SABBADIN, A. (1996). New data on phagocytes and phagocytosis in the compound ascidian *Botryllus schlosseri* (Tunicata, Ascidiacea). *Ital J Zool* 63: 357-364.
- CIUFOLINI, M. A., SHEN, Y. C., BISHOP, M. J. (1995). A unified strategy for the synthesis of sulfur containing pyridoacridine alkaloids: antitumor agents of marine origin. *J Am Chem Soc* 117(50): 12460-12469.
- CLONEY, R. A., CAVEY, M. J. (1982). Ascidian larval tunic: Extraembryonic structures influence morphogenesis. *Cell Tissue Res* 222(14): 547-562.
- CLONEY, R. A. (1990). Larval tunic and the function of test cells in ascidians. *Acta Zool (Stockholm)* 71(3): 151-159.
- COOPER, E. L., MANSOUR, M. H., NEGM, H. I. (1996). Marine invertebrates immunodefense response: molecular and cellular approaches in tunicates. *Ann Rev Fish Dis* 6: 133-149.
- DASSONNEVILLE, L., WATTEZ, N., BALDEYROU, B., MAHIEU, C., LANSIAUX, A., BANAIGS, B., BONNARD, I., BAILLY, C. (2000). Inhibition of topoisomerase II by the marine alkaloid ascididemin and induction of apoptosis in leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 60: 527-537.
- DE LEO, G., PATRICOLO, E., D'ANCONA LUNETTA, G. (1977). Studies on the fibrous components of the test of *Ciona intestinalis* Linnaeus. I. Cellulose-like Polysaccharide. *Acta Zool (Stockholm)* 58: 135-141.
- DE LEO, G., PATRICOLO, E., FRITTITTA, G. (1981). Fine Structure of the tunic of *Ciona intestinalis* L. II. Tunic morphology, cell distribution and their functional importance. *Acta Zool (Stockholm)* 62(4): 259-271.
- DE ROSA, M., GIORDANO, S., SCETTRI, A., SODANO, G., SORIENTE, A., GARCIA PASTOR, P., ALCARAZ, M. J., PAYA, M. (1998). Synthesis and comparison of the antiinflammatory activity of Manoalide and Cacospongionolide B Analogues. *J Med Chem* 41: 3232-3238.
- DELFOURNE, E., BONTEMPS-SOUBIELOS, N., BASTIDE, J. (2000). Structure revision of the marine pentacyclic aromatic alkaloid: cystodamine. *Tetrahedron Lett* 41: 3863-3864.
- DI BELLA, M. A., CASSARÀ, G., RUSSO, D., DE LEO, G. (1998). Cellular components and tunic architecture of the solitary ascidian *Styela canopus* (Stolidobranchiata, Styelidae). *Tissue Cell* 30(3): 352-359.



- FALBE, J., REGITZ, M. (1989). Römmpp Chemie Lexikon. 9. Auflage. Stuttgart, Thieme.
- FAULKNER, D. J. (1996). Marine Natural Products. *Nat Prod Rep* 13(2): 75-125.
- FELBECK, J. (1989). Symbiosis of bacteria with invertebrates in the deep sea. 4th International colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, Villeurbanne, INRA.
- FIALA-MEDIONINI, A., FELBECK, H., CHILDRESS, J. J., FISHER, C. R., VETTER, R. D. (1989). Lysosomal resorption of bacterial symbionts in deep-sea bivalves. 4th International colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, Villeurbanne, INRA.
- FUSETANI, N. (2000). *Drugs from the sea*. Basel, S. Karger.
- GODEAUX, J. (1964). Le revêtement cutané des Tuniciers. *Studium generale* 17(3): 176-190.
- GOETTE, A. (1902). *Lehrbuch der Zoologie*. Leipzig, W. Engelmann.
- GOODBODY, I. (1974). The Physiology of Ascidians. *Adv Mar Biol* 12: 2-149.
- GÖTTING, K.-J., KILIAN, E. F., SCHNETTER, R. (1982). Einführung in die Meeresbiologie 1 Marine Organismen - Marine Biogeographie. Braunschweig, Wiesbaden, F. Vieweg & Sohn.
- GRASSE, P.-P. (1948). *Traité de Zoologie (Anatomie, Systematique, Biologie). Echinodermes, Stomocordés, Procordés*, Tome XI: 906-930. Paris, Masson.
- HALE, A. J. (1957). The Histochemistry of Polysaccharides. *Int Rev Cytol* 6: 193-264.
- HALL, D. A., SAXL, H. (1961). Studies of human and tunicate cellulose and of their relation to reticulin. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 155: 168-178.
- HAWKINS, C. J., JAMES, G. A., PARRY, D. L., SWINEHART, J. H., WOOD, A. L. (1983). Intracellular acidity in the ascidian. *Comp Biochem Physiol* 76 B(3): 559-565.
- HAY, E. D. (1981). Extracellular matrix. *J Cell Biol* 91(No. 3 Pt. 2): 205-223.
- HAYGOOD, M. J., SCHMIDT, E. W., DAVIDSON, S. K., FAULKNER, D. J. (1999). Microbial symbionts of marine invertebrates. Opportunities for Microbial Biotechnology. *J Mol. Microbiol Biotechnol* 1(1): 33-43.
- HERTWIG, R. (1892). *Lehrbuch der Zoologie*. Jena, G. Fischer.

- HIROSE, E. (1992). Tunic cells in *Leptoclinides echinatus* (Didemnidae, Ascidiacea): An application of scanning electron microscopy for paraffin embedding specimens. *Hiyoshi Rev Nat Sci* 11: 5-8.
- HIROSE, E. (1999). Pigmentation and acid storage in the tunic: protective functions of the tunic cells in the tropical ascidian *Phallusia nigra*. *Invertebr Biol* 118(4): 414-422.
- HIROSE, E. (2000). Plant rake and algal pouch of the larvae in the tropical Ascidian *Diplosoma similis*: An adaptation for vertical transmission of photosynthetic symbionts *Prochloron* sp. *Zool Sci* 17: 233-240.
- HIROSE, E., AOKI, M., CHIBA, K. (1996a). Fine structures of tunic cells and distribution of bacteria in the tunic of the luminescent ascidian *Clavelina miniata* (Ascidiacea, Urochordata). *Zool Sci* 13: 519-523.
- HIROSE, E., ISHII, T., SAITO, Y., TANEDA, Y. (1994a). Phagocytic activity of tunic cells in the colonial ascidian *Aplidium yamazii*: (Polyclinidae, Aplousobranchia). *Zool Sci* 1: 203-208.
- HIROSE, E., ISHII, T., SAITO, Y., TANEDA, Y. (1994b). Seven types of tunic cells in the colonial ascidian *Aplidium yamazii* (Polyclinidae, Aplousobranchia): Morphology, classification and possible functions. *Zool Sci* 11: 737-743.
- HIROSE, E., MARUYAMA, T., CHENG, L., LEWIN, R. A. (1996b). Intracellular symbiosis of a photosynthetic prokaryote, *Prochloron* sp., in a colonial ascidian. *Invertebr Biol* 115(4): 343-348.
- HIROSE, E., MARUYAMA, T., CHENG, L., LEWIN, R. A. (1998a). Intra- and extra-cellular distribution of photosynthetic prokaryotes, *Prochloron* sp., in a colonial ascidian: Ultrastructural and quantitative Studies. *Symbiosis* 25: 301-310.
- HIROSE, E., NISHIKAWA, T., SAITO, Y., WATANABE, H. (1992). Minute protrusions of ascidian tunic cuticle: Some implications for the ascidian phylogeny. *Zool Sci* 9: 405-412.
- HIROSE, E., SAITO, Y. WATANABE, H. (1991). Tunic cell morphology and classification in botryllid ascidians. *Zool Sci* 8: 951-958.
- HIROSE, E., YOSHIDA, T., AKIYAMA, T., ITO, S., IWANAMI, Y. (1998b). Pigment cells representing polychromatic colony colour in *Botrylloides simodensis* (Ascidiacea, Urochordata): Cell morphology and pigment substances. *Zool Sci* 15: 489-497.
- HOLLAND, N. D., NEALSON, K. H. (1978). The fine structure of the echinoderm cuticle and the subcuticular bacteria of echinoderms. *Acta Zool (Stockholm)* 59: 169-185.

- HOLMSTRÖM, C., JAMES, S., NEILAN, B. A., WHITE, D. C., KJELLEBERG, S. (1998). *Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. *Int J Syst Bacteriol* 48: 1205-1212.
- HOLMSTRÖM, C., KJELLEBERG, S. (1999). Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 285-293.
- HUUS, J., IHLE, I. E. W., LOHMANN, H., NEUMANN, G. (1956). *Tunicata*. Berlin, Walter de Gruyter & Co.
- IZZARD, C. S. (1974). Contractile filopodia and *in vivo* cell movement in the tunic of the ascidian, *Botryllus schlosseri*. *J Cell Sci* 15: 513-535.
- KLEINIG, H., SITTE, P. (1992). *Zellbiologie: ein Lehrbuch*. Stuttgart, Jena, New York, G. Fischer.
- KRISHNAN, G. (1975). Nature of tunicin and its interaction with other chemical components of the tunic of the Ascidian, *Polyclinum madrasensis* Sebastian. *Indian J Exp Biol* 13: 172-176.
- KRISHNAN, G., RAMAMURTHI, R. (1976). On the polysaccharide-protein complexes of the tunic of *Polyclinum madrasensis* Sebastian. *Indian J Exp Biol* 14: 113-116.
- LAMBERT, G. (1979). Early Post-metamorphic growth, budding and spicule formation in the compound ascidian *Cystodytes lobatus*. *Biol Bull (Woods Hole)* 157: 464-477.
- LAMBERT, G. (1992). Ultrastructural aspects of spicule formation in the solitary ascidian *Herdmania momus* (Urochordata, Ascidiacea). *Acta Zool (Stockholm)* 73(4): 237-245.
- LAMBERT, G., LAMBERT, C. (1997). Extracellular formation of body and tunic spicules in the New Zealand solitary ascidian *Pyura pachydermatina* (Urochordata, Ascidiacea). *Acta Zool (Stockholm)* 78(1): 51-60.
- LEONHARDT, H. (1990). *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Stuttgart, Thieme.
- LINNAEUS, C. (1758). *Systema Naturae*. Stockholm, Laurentius Salvius.
- LISON, L. (1960). *Histochimie et cytochimie animales-principes et methodes*. Paris, Gauthier-Villars.

- LOWENSTAM, H.A. (1989). Spicular morphology and mineralogy in some Pyuridae (Ascidacea). *Bull Mar Sci* 45(2): 243-252.
- LUDWIG, H. (1883). Dr. Johannes Lennis Synopsis der Thierkunde. Hannover, Hahn.
- LÜBBERING-SOMMER, B., COMPÈRE, P., GOFFINET, G. (1996). Cytochemical investigations on tunic morphogenesis in the sea peach *Halocynthia papillosa* (Tunicata, Ascidacea). 1: Demonstration of polysaccharides. *Tissue Cell* 28(5): 621-630.
- MCDONALD, L. A., ELDREDGE, G. S., BARROWS, L. R., IRELAND, C. M. (1994). Inhibition of Topoisomerase II Catalytic activity by Pyridoacridine alkaloids from a *Cystodytes* sp. ascidian: A mechanism for the apparent intercalator-induced inhibition of Topoisomerase II. *J Med Chem* 37: 3819-3827.
- MCKENZIE, J. D., GRIGOLAVA, I. V. (1996). The echinoderm cuticle and its role in preventing microfouling. *Biofouling* 10(1-3): 261-272.
- MILANESI, C., BURIGHEL, P. (1978). Blood cell ultrastructure of the ascidian *Botryllus schlosseri*. I. Hemoblast, Granulocytes, Macrophage, Morula cell and Nephrocyte. *Acta Zool (Stockholm)* 59: 135-147.
- MILLAR, R. H. (1970). British ascidians. London, New York, Academic Press.
- MILLAR, R. H. (1971). The biology of acidians. *Adv Mar Biol* 9: 1-100.
- MISHRA, A. K., COLVIN, J. R. (1969). The microscopic and submicroscopic structure of the tunic of two ascidians, *Boltenia* and *Molgula*. *Can J Zool* 47: 659-663.
- MITCHELL, S. S., RHODES, D., BUSHMAN, F. D., FAULKNER, D. J. (2000). Cyclodidemniserinol trisulfate, a sulfated serinolipid from the Palauan ascidian *Didemnum guttatum* that inhibits HIV-1 integrase. *Org Lett* 2(11): 1605-1607.
- MONNIOT, F. (1970). Les spicules chez les tuniciers aplousobranches. *Arch Zool Exp Gen* 111: 303-311.
- MONNIOT, F. (1972a). Ascidiées aplousobranches des Bermudes: Polyclinidae et Polycitoridae. *Bull Mus Hist Nat Paris* 3(82): 949-962.
- MONNIOT, C., MONNIOT, F. (1972b). Clé mondiale des genres d'ascidiées. *Arch Zool Exp Gen* 113: 311-369.



- MÜLLER, W. E. G., BÖHM, M., BATEL, R., DE ROSA, S., TOMMONARO, G., MÜLLER, I. M., SCHRÖDER, H. C. (2000). Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges : Synthesis of Avarol by Primmorphs from *Dysidea avara*. J Nat Prod 63 :1077-1081.
- NULTSCH, W. (1995). Mikroskopisch-Botanisches Praktikum. Stuttgart, Thieme.
- PARDY, R. L., LEWIN, R. A. (1981). Colonial ascidians with prochlorophyte symbionts: Evidence for translocation of metabolites from alga to host. Bull Mar Sci 31(4): 817-823.
- PARRY, D. L., KOTT, P. (1988). Co-Symbiosis in the ascidiacea. Bull Mar Sci 42(1): 149-153.
- PATRICOLO, E., DE LEO, G. (1979). Studies on the fibrous components of the test of *Ciona intestinalis* Linnaeus. II. Collagen-Elastin-Like Protein. Acta Zool (Stockholm) 60: 259-269.
- PAVÃO, M., AIELLO, K., WERNECK, C., SILVA, L., VALENTE, A.-P., MULLOY, B., COLWELL, N., TOLLEFSEN, D., MOURÃO, P. (1998). Highly sulfated dermatan sulfates from ascidians. J Biol Chem 273(43): 27848-27857.
- PAWLIK, J. R. (1993). Marine invertebrate chemical defenses. Chem Rev 93(5): 1911-1922.
- PERES, J.-M. (1956). Études sur le seuil siculo-tunisien: Ascidies. Ann Inst Oceanogr (Paris) 33 (1265-303).
- PEROVIC, S., WICHELS, A., SCHÜTT, C., GERDTS, G., PAHLER, S., STEFFEN, R., MÜLLER, W. E. G. (1998). Neuroactive compounds produced by bacteria from the marine sponge *Halichondria panicea*: activation of the neuronal NMDA receptor. Env Toxicol Pharmacol 6: 125-133.
- PIETRA, F. (1990). A secret world. Natural Products of Marine Life. Basel, Boston, Berlin, Birkhäuser.
- PLATTNER, H., ZINGSHEIM, H.-P. (1987). Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie. Stuttgart, New York, G. Fischer.
- RAMI REDDY, M. V., RAMA RAO M., RHODES, D., HANSEN, M., RUBINS, K., BUSHMAN, F., VENKATESVARLU, Y., FAULKNER, D. (1999). Lamellarin a 20-Sulfate, an inhibitor of HIV-1 integrase active against HIV-1 virus in cell culture. J Med Chem 42(11): 1901-1907.
- REYNOLDS, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 17: 208-212.

- RHEINHEIMER, G. (1991). Mikrobiologie der Gewässer. Jena, Stuttgart, G. Fischer.
- RIEDL, R. (1983). Fauna und Flora des Mittelmeeres. Hamburg, Parey.
- RINEHART, K. L., GLOER, J. B., COOK, J. C. (1981). Structures of the didemnins, antiviral and cytotoxic depsipeptides from a caribbean Tunicate. J Am Chem Soc 103: 1857-1859.
- RINEHART, K. L. (2000). Antitumor compounds from tunicates. Med Res Rev 20(1): 1-27.
- RINKEVICH, B., TARTAKOVER, S., GERSHON, H. (1998). Contribution of morula cells to allogeneic responses in the colonial urochordate *Botryllus schlosseri*. Mar Biol 131: 227-236.
- ROBINSON, W. E., AGUDELO, M. I., KUSTIN, K. (1984). Tunichrome content in the blood cells of the tunicate *Ascidia callosa* Stimpson, as an indicator of vanadium distribution. Comp Biochem Physiol 78A(4): 667-673.
- RORRER, G. L., MULLIKIN, R., HUANG, B., GERWICK, W. H., MALIAKAL, S., CHENEY, D. P. (1999). Production of bioactive metabolites by cell and tissue cultures of marine macroalgae in bioreactor systems. Plant Cell Tissue Cult. Prod. Food Ingredients: 165-184.
- ROWLEY, A.F., RHODES, C. P., RATCLIFFE, N. A. (1984). Protochordate leucocytes: a review. Zool J Linn Soc 80: 283-295.
- RYLAND, J. S. (1979). Structural and physiological aspects of coloniality in Bryozoa. *Biology and systematics of colonial organisms*. G. Larwood, B. R. Rosen. London, New York, San Francisco, Academic Press. 11: 211-242.
- SCHLEE, D. (1992). Ökologische Biochemie. Jena, Stuttgart, New York, G. Fischer.
- SCOTT, J. E. (1985). Proteoglycan Histochemistry - A Valuable Tool for Connective Tissue Biochemists. Collagen Rel Res 5: 541-575.
- SITTE, P., ZIEGLER, H., EHRENDORFER, F., BRESINSKY, A. (1991). Strasburger Lehrbuch der Botanik, G. Fischer.
- SMITH, M. J. (1970a). The blood cells and tunic of the ascidian *Halocynthia aurantium* (Pallas). I. Hematology, tunic morphology and partition of cells between blood and tunic. Biol Bull (Woods Hole) 138: 354-378.
- SMITH, M. J. (1970b). The blood cells and tunic of the ascidian *Halocynthia aurantium* (Pallas). II. Histochemistry of the blood cells and tunic. Biol Bull (Woods Hole) 138: 379-388.

- SMITH, M. J. (1989). Vanadium biochemistry: The unknown role of vanadium-containing cells in ascidians (sea squirts). *Experientia* (Basel) 452-457.
- SMITH, M. J., DEHNEL, P. A. (1971). The composition of tunic from four species of ascidians. *Comp. Biochem. Physiol.* 40b: 615-622.
- SMITH, M. J., PAUL A. (1970). The chemical and enzymatic analyses of the tunic of the ascidian *Halocynthia aurantium* (Pallas). *Comp Biochem Physiol* 35: 17-30.
- STEFFAN, B., BRIX, K., PÜTZ, W. (1993). Biosynthesis of Shermilamine B. *Tetrahedron* 49(28): 6223-6228.
- STOECKER, D. (1978). Resistance of a tunicate to fouling. *Biol Bull* (Woods Hole) 155: 615-622.
- SWIFT, H., ROBERTSON, D. L. (1991). Structural Aspects of *Prochloron*-Tunicate Symbiosis. *Symbiosis* 10: 95-113.
- TARDENT, P. (1993). *Meeresbiologie*. Stuttgart, Thieme.
- TANAKA, K., MITSUSHIMA, A. (1984). A preparation method for observing intracellular structures by scanning electron microscopy. *J Microsc* 133(2): 213-222.
- TAYLOR, S. W., KAMMERER, B., BAYER, E. (1997). New perspectives in the chemistry and biochemistry of the tunichromes and related compounds. *Chem Rev* 97: 333-346.
- THOMPSON, T. E. (1988). Acidic allomones in marine organisms. *J Mar Biol Ass U.K.* 68: 499-517.
- TURON, X. (1992). Periods of non-feeding in *Polysyncraton lacazei* (Ascidacea: Didemnidae): A rejuvenative process ? *Mar Biol* 112: 647-655.
- VAN DAELE, Y. (1990). Organization of the integument of the ascidians *Halocynthia papillosa* Gun. and *Phallusia mammillata* Cuv. (Urochordata, Ascidacea). Morphogenesis, ultrastructure and chemical composition of the tunic in connection with its physical properties. *Bull Soc R Sci Liège* 59(5): 331-415.
- VAN DAELE, Y., REVOL, J.-F., GAILL, F., GOFFINET, G. (1992). Characterization and supramolecular architecture of the cellulose-protein fibrils in the tunic of the sea-peach (*Halocynthia papillosa*, Ascidacea, Urochordata). *Biol Cell* 76: 87-96.
- VAN NAME, W. G. (1945). The North and South American Ascidians. *Bull Amer Mus Nat Hist* 84: 1-476.

- WAHL, M., JENSEN, P. R., FENICAL, W. (1994). Chemical control of bacterial epibiosis on ascidians. *Mar Ecol Prog Ser* 110: 45-57.
- WAHL, M. (1995). Bacterial epibiosis on Bahamian and Pacific ascidians. *J Exp Mar Biol Ecol* 191: 239-255.
- WANNER, G., FORMANEK, H., THEIMER, R. R. (1981). The ontogeny of lipid bodies (Spherosomes) in Plant Cells. *Planta* 151: 109-123.
- WANNER, G., KÖST, H.-P. (1984). „Membrane Storage” of the red alga *Porphyridium cruentum* during nitrate and sulphate starvation. *Z Pflanzenphys* 113(3): 251-262.
- WEIBEL, E. R. (1973). Stereological techniques for electron microscopic morphometry. *Principles and techniques of electron microscopy*. 3:237-296. New York, Van Nostrand Reinhold.
- WELSCH, U. (1997). Sobotta Histologie. München, Wien, Baltimore, Urban und Schwarzenberg.
- WESTHEIDE, W., RIEGER, R. (1996). Spezielle Zoologie, Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere. Stuttgart, G. Fischer.

### **Populärwissenschaftliche Artikel:**

- Apotheke Ozean - Meeresbewohner liefern die Medizin der Zukunft.  
P. M. Mai 2000: 8-14.
- ENGELN, H. (1994). Medizin vom Meeresgrund. *GEO Magazin* 9/1994: 157-158.
- PREIHERR, C. (1999). Die Heilkraft aus dem Meer. *natur & kosmos* 7/1999.
- THOMSEN, C. (2000). Tauchgang in die Pharmaküche. *Der Spiegel*. 8/2000: 264-266.



## Danksagung

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt allen, die mich im Verlauf dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben:

**Prof. Dr. Gerhard Wanner** für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe; für die Möglichkeit zur Promotion an einem – zumindest am Standort München – ungewöhnlichen Thema; für die ausgezeichnete und auf aktuellem Stand gehaltene Infrastruktur; für die ständige Bereitschaft, sich mit präparativen und wissenschaftlichen Fragen meinerseits auseinanderzusetzen und seine Aufgeschlossenheit gegenüber Weiterbildungskursen.

**Dr. Bert Steffan** für die vielen Diskussionen zum Thema „Pyridoacridinalkaloide“, den großen persönlichen Einsatz „rund um die Uhr“ beim Sammeln und Bestimmen von Ascidien und die Überlassung von Proben des mühevoll isolierten Shermilamin B.

**Prof. Dr. Reinhard Wirth** für die Isolierung und Kultivierung dreier Bakterienstämme aus *Cystodytes dellechiaiei*-Kolonien und die 16s-RNS-Sequenzierung dieser Arten.

**Prof. Dr. Jörg Fromm** und **Dr. Elisabeth Windeisen** (Lehrstuhl Holzforschung der TU München) für die Analyse von Proben zur Bestimmung des Anteils an organischer Substanz.

**Dr. Dorothee Schroth** und der **Fa. Leica Microsystems** für die Aufnahmen am KLSM.

**Dr. habil. Helmut Formanek** für die Beantwortung zahlreicher (teils etwas alchimistischer) Fragen und die Möglichkeit, in seinem unerschöpflichen Chemikalienregal nach interessanten Färbereagenzien zu fahnden.

**Prof. Dr. Jürke Grau** für die Möglichkeit, im Histologie-Labor des Instituts für Systematische Botanik Paraffineinbettungen durchzuführen.

**Prof. Dr. Reinhold Herrmann** und **Prof. Dr. Ulrich Koop** für die Nutzungsmöglichkeit von Fluoreszenzmikroskop und Osmometer.

**Tony Murray** und den Mitarbeitern der Tauchbasis „Unisub Estartit“ für die Unterstützung bei der Probenbeschaffung.

**Sabine Steiner**, **Silvia Dobler** und **Cornelia Niemann** für die ungezählten Tipps und Hilfen bei der Präparation von Proben und der Bedienung der Laborgerätschaften, für die stets gutgelaunte Stimmung im Labor und die deutliche Verbesserung meiner Vitaminversorgung.

**Dr. Armin Bock**, **Dr. Eva Facher**, **Andrea Plieninger**, **Birgit Röble**, **Elizabeth Schröder-Reiter** und **Ursula Wengenroth** für die moralische Unterstützung, hilfreichen Dispute und die gemeinsame Lösung von Sprach- und Computerproblemen.

**Dr. Ronald Natzer** für die immerwährende Unterstützung und kritische Aufmunterung, die vertrauensvolle Überlassung seines Computers und seine große Begeisterung für die Taucherei.

Diese Arbeit wurde gefördert durch **SFB 369: „Molekulare Grundlagen des Sekundärstoffwechsels“** und **BMBF-Verbundprojekt „Endo- und exocytische Mikroorganismen in marinen Makroorganismen: Eine Quelle für neue biologisch aktive Naturstoffe ?“**. Allen Mitarbeitern dieser Verbundprojekte danke ich ausdrücklich für die gute Zusammenarbeit.

## Publikationen:

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

ROTTMAYR, E.-M., STEFFAN, B., WANNER, G. (2001)  
Pigmentation and tunic cells in *Cystodytes dellechiaiei* (Urochordata, Ascidiacea)  
Zoomorphology 120: 159–170

Posterbeitrag:

E.-M. ROTTMAYR, G. WANNER (1999) Arzneimittel aus Tunikaten ? Posterpräsentation beim  
Statusseminar 1999 des SFB 369: „Molekulare Grundlagen des Sekundärstoffwechsels“.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Eva-Maria Rottmayr  
Anschrift Beethovenstr. 8a  
85375 Neufahrn bei Freising

Geburtsdatum 03.03.1972  
Geburtsort Bünde  
Familienstand ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schulausbildung

1978 - 1982 Grundschule der Armen Schulschwestern am Anger, München  
1982 - 1991 Gymnasium der Armen Schulschwestern am Anger, München  
Abschluß: Abitur

## Studium

1991 - 1997 Studium der Biologie an der Ludwig–Maximilians–Universität,  
München  
Abschluß: Diplomprüfung

## Promotion

seit Juli 1997 Promotion; Förderung durch SFB 369: „Molekulare Grundlagen des  
Sekundärstoffwechsels“ und BMBF-Verbundprojekt „Endo- und  
exocytische Mikroorganismen in marinen Makroorganismen: Eine  
Quelle für neue biologisch aktive Naturstoffe ?“

## Fortbildung

1999 Ausbildung und Prüfung zum Forschungstaucher  
an der Biologischen Anstalt Helgoland; Alfred–Wegener–Institut,  
Bremerhaven